

Attachment von E. Coli an den Epithelien
der ableitenden Harnwege

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der
gesamten Medizin

an der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von

Mahmoud SEIF EL NASR

aus Alexandria

München ~~1983~~

1984

Aus der Kinderklinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. H.-B. Hadorn

ATTACHMENT VON E. COLI AN DEN EPITHELIIEN DER ABLEITENDEN
HARNWEGE

Der Einfluß von Urin von HWI-Patientinnen und gesunder
Probandinnen auf das Attachment

Inaugural-Dissertation
zur erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Mahmoud SEIF EL NASR
aus Alexandria

München 1983

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München.

Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Marget
Mitberichterstatter:	— — — —
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 31.01.84

D a n k s a g u n g

Herrn Prof. Dr. Marget danke ich an dieser Stelle für seine Betreuung während meiner Doktoranden-Zeit, vorallem für den großzügig gewährten Spielraum für eigene Ideen und Versuche und seine dabei stets gleichbleibend freundliche Ansprechbarkeit und Unterstützung.

Für ihre freundliche Hilfe bei meiner Einarbeitung sowie ihre Unterstützung und für die gute Zusammenarbeit, möchte ich auch Fr. Dr. Gabi Fuhrmann. Fr. Anna Macellaro sowie Fr. Anke Ryermann - an der Universitäts Kinderklinik - herzlich danken. Ich denke gern zurück an diese nicht nur arbeitsame Zeit im Labor.

Desweiteren bedanke ich mich bei allen meinen anderen Ansprechpartnern an den verschiedenen Kliniken für so manchen hilfreichen Tip.

Mein besonderer Dank gilt auch Fr. Dr. C. Svanborg Edén et.al. für die freundliche Überlassung des verwendeten T₁ E. coli Stammes.

Abstract

Ausgehend von der Vermutung, im Harn gesunder Probanden eine Attachment verhindernde Substanz zu finden, die möglicherweise bei HWI-Patienten fehlt, untersuchten wir den Einfluß von Urin auf das Attachmentverhalten von *E. coli* an Uroepithelien. Hierfür wurden in einem in-Vitro-Test-System, *E. coli* mit Uroepithelien einer gesunden Spenderin im Urinmilieu inkubiert. In verschiedenen Ansätzen verwendeten wir bei der Inkubation: - in Urin gezüchtete Bakterien, - mit Urin vorbehandelte Bakterien, - vorbehandelte Zellen und - vorbehandelte Bakterien und Zellen. Desweiteren untersuchten wir den Einfluß von Urin auf bereits haftende Keime. Die Studien wurden in zwei Gruppen, mit Urin von fünf gesunden Probandinnen bzw. fünf HWI-Patientinnen, durchgeführt, wobei stets ein PBS-Ansatz als Kontrolle diente. Die Urinkonzentrationen in den Testansätzen entsprachen den physiologischen Verhältnissen. Eine weitere Versuchsreihe mit höheren Konzentrationen war aus Materialmangel leider nicht mehr möglich.

Entgegen unseren Erwartungen waren die Zahlen der haftenden Keime in allen Ansätzen in denen Patientenurin verwendet wurde, niedriger als bei den Ansätzen mit Probandenurin. Bei den Vorbehandlungen mit Patientenurin waren die Attachmentwerte geringfügig niedriger als bei den Vorbehandlungen mit Probandenurin und die in Patientenurin gezüchteten Keime hafteten geringfügig schlechter als die in Probandenurin gezüchteten. Einen Einfluß von Urin auf bereits haftende Keime konnten wir, ohne Berücksichtigung der propulsiven Mechanismen des Harnflusses, nicht nachweisen. Die Attachmentwerte waren, bis auf eine Reihe, in PBS wesentlich niedriger als im Urinmilieu.

Aus den Ergebnissen der Studie kann angenommen werden, daß möglicherweise die Uroepithelien HWI disponierter Patientinnen nicht in der Lage sind, die von ihnen sezernierten Glykokalix-Bestandteile an ihrer Oberfläche zu halten und sich dadurch

gegen das Attachment zu schützen. Die im Sinne eines erhöhten Turnovers vermehrt im Patientenurin ausgeschiedenen Mucoproteine und Mucopolysaccharide wären dann, unserer Theorie zur Folge, für den Einfluß von Patientenurin auf das Attachment verantwortlich. Desweiteren zeigte die Studie, daß PBS für Attachmentversuche ein wahrscheinlich zu insuffizientes Milieu ist. Auf Grund der geringen Fallzahlen, messen wir unserer Studie nur einen prospektiven Charakter zu. Weitere Vergleichsuntersuchungen, mit höheren Urinkonzentrationen und verschiedenen Urinfraktionen, halten wir für sinnvoll.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
A. Einleitung	1
(Grundlagen und Stand der Erkenntnisse)	
- Die Problematik der HWI. Ihre Häufigkeit, Rezidive und Folgen.	1
- Zur Pathogenese:	
Infektionsweg, Attachment und Disposition.	2
- Kein immunologisches Problem!	5
- Andere Schutzmechanismen?	6
B. Eigene Untersuchungen	7
- Grundlagen zur Untersuchung und Vorgehen.	7
- Patienten - Material und Methoden:	8
+ Patienten.	8
+ Material.	9
• Der Urin.	9
• Die Zellen.	11
• Die Bakterien.	13
+ Methoden.	13
• Keimzahlbestimmung im Mittelstrahlurin.	13
• In Vitro Attachment- und Desorption-Test.	15
• Attachment in PBS und Urin.	15
• Desorption durch Reinkubation in PBS und Urin.	16
• Bakterienwachstum in Urin-Milieu.	17
• Attachment in PBS mit in Urin gezüchteten Keimen.	17
• Agglutinationsvermögen von Urin auf T ₁ E. coli O- und H-AG.	18
• Antigenherstellung.	18
• Gruber - Widal Agglutinationstest.	19

	Seite
C. Ergebnisse	22
- Einfluß der verschiedenen Vorbehandlungsarten auf das Attachment in PBS.	22
- Das Bakterienwachstum in Urin.	25
- Einfluß der Bakterienzüchtung in Urin auf das Attachment in PBS.	25
- Einfluß der verschiedenen Vorbehandlungsarten auf das Attachment in Urin.	26
- Attachment in Urin gegenüber dem in PBS.	27
- Desorption von in PBS angehafteten Keimen durch Reinkubation in PBS oder Urin.	27
- Desorption von in Urin angehafteten Keimen durch Reinkubation in PBS oder Urin.	28
- Agglutinationsvermögen von Urin auf T ₁ E. coli O- und H-Antigene.	29
- Zusammenfassung der Ergebnisse.	30
D. Statistik	34
E. Diskussion	39
F. Literaturverzeichnis	45

A. EINLEITUNG

(Grundlagen und Stand der Erkenntnisse)

Die Problematik der HWI. Ihre Häufigkeit, Rezidive und Folgen
Harnwegsinfektionen (HWI) sind die häufigsten, nicht epidemiologischen, bakteriellen Infektionen im Kindesalter. Die Angaben hierzu sind alters- und geschlechtsabhängig, schwanken jedoch in den einzelnen Publikationen nur innerhalb enger Grenzen (56,61,62,64,91,95,118). Einig sind sich die Autoren auch hinsichtlich der Geschlechtsverteilung. Ausgenommen der ersten Lebensmonate und des hohen Alters ist eine deutliche Prävalenz des weiblichen Geschlechts zu erkennen (1,14,52,59,93). Dies wird zum Teil mit der längeren männlichen Urethra (37) und mit der Bakterizidität des Prostatasekrets erklärt (19,99).

Nach Kunin et al. ist die Bakteriurie im Schul- und Vorschulalter bei Mädchen etwa vierzig Mal häufiger als bei Knaben (59). In der gleichen Arbeit fand er für ein Kollektiv junger Mädchen im Vorschulalter anlässlich einer Screeningsuntersuchung eine Häufigkeit von 1 - 2 %. Eine Verlaufsuntersuchung ergab, daß der Prozentsatz für Mädchen des gleichen Kollektivs bei regelmäßigen Kontrollen jährlich um etwa 0,32 % durch Neuerkrankungen zunimmt. Danach haben ca. 5 % aller Mädchen bis zur Beendigung ihrer Schulzeit zumindest eine HWI durchgemacht (59,62). Häufig jedoch bleibt es nicht bei einer Infektion; 25 - 60 % aller Schulumädchen mit einer asymptomatischen Bakteriurie (ABU) oder einer HWI rezidivieren, trotz Therapie, innerhalb eines Jahres (3,15,60,86). Bis zu 70 % dieser Rezidive sind, wie die Typisierung der isolierten Keime ergab, als Neuinfektionen, also als rekurrende Infektionen zu betrachten (2,3,70). Im Krankengut unserer Harnwegssprechstunde - meist Problempatientinnen mit häufig rekurrenden Infektionen - liegt dieser Prozentsatz sogar bei

83 %. Das Risiko eines Rezidivs oder einer rekurrierenden Infektion ist für Mädchen größer als für Knaben und am größten innerhalb von 2 - 3 Monaten nach einer abgelaufenen Infektion (118). HWI sind also auch nach erfolgreicher Antibiotikatherapie häufig noch nicht ausgestanden. Langzeitkatamnesen haben gezeigt, daß für die Prognose eine spätere Nierenbeteiligung mit in Betracht gezogen werden muß. Nachuntersuchungen haben ein Spectrum von leichten radiologischen Veränderungen bis hin zu ernststen Nierenparenchydefekten ergeben (8,39,66,69,73,89,101,115,122). 7 % der Mädchen mit normalem Urogramm bei ihrer ersten HWI zeigen bei Kontrolluntersuchungen nach 4 - 7 Jahren Narbenbildungen (97,121).

Bei vielen Mädchen im Kindesalter wird eine HWI erst durch Screeninguntersuchungen oder als Zufallsbefund, häufig jedoch gar nicht diagnostiziert. Sie haben eine sogenannte ABU. ABU ist eine diagnostische Bezeichnung für Patienten, deren Laborbefunde für eine HWI sprechen, die jedoch subjektiv keine Beschwerden haben. Diese symptomlose Infektion ist keinesfalls immer harmlos. Ihre Bedeutung ergibt sich möglicherweise aus postmortem Studien mit einer großen Zahl von Pyelonephritischen Befunden bei Patienten die anamnestic keine HWI hatten. Diese pyelonephritischen Narbenbildungen im Kindesalter können sich jedoch im Erwachsenenalter manifestieren und zu einer chronischen Pyelonephritis oder sogar bis zum Nierenversagen führen (39,50,51,87). Frühe und häufige Rezidive bzw. rekurrierende Infektionen scheinen diese Risiken zu erhöhen (122). Andere Autoren allerdings lehnen eine bakterielle Infektion als alleinigen ursächlichen Faktor für signifikante Nierenschäden ab (21,22,76,94).

Zur Pathogenese: Infektionsweg, Attachment und Disposition.

Die Pathogenese der HWI ist noch weitgehend unbekannt. Ab-

flußbehinderungen im Urogenitaltrakt werden für die 10 % der sogenannten obstruktiven HWI als pathogenetischer Mechanismus angesehen (3,120). Neben diesen unbestreitbar wichtigen, mechanisch-urodynamischen Faktoren muß es jedoch, vor allem für die 90 % der HWI ohne primären Harnabflußstörungen, andere pathogenetische Erklärungen geben.

Wir wollen uns im Folgenden nur mit diesen Arten der HWI beschäftigen. Der ascendierende Infektionsweg ist mittlerweile allgemein anerkannt (9,11,38,44,75,113). Als Erregerreservoir gilt in den meisten Fällen die Darmflora des Patienten selbst (9,31,68,75,110,111,114). Den Hygienischen Faktoren, wie Schmierinfektion und Kontamination, wird jedoch keine besondere Bedeutung zugemessen (5,6,118). Haupterreger der HWI sind mit ca. 80 % *E. coli* (9,65), des weiteren in dieser Reihenfolge Enterokokken, *Proteus*, *Pseudomonas*, Klebsiellen und Staphylokokken (45).

Wie aber können die ascendierenden Keime dem Harnfluß bei der Miktion (Voiding) widerstehen und in der Blase bzw. in den ableitenden Harnwegen persistieren? In letzter Zeit ist dem bakteriellen Haftungsvermögen an Mucosaoberflächen (Attachment), im Hinblick auf eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese von Kolonisation und Infektion, große Beachtung geschenkt worden. Dies vor allem bei Mucosaoberflächen, die propulsiven Mechanismen, wie z. B. dem Blut- oder Harnfluß oder anderen Sekretionen, unterliegen (25,26,27,28,44,71,80,90,106). Das Angehen einer Infektion wird als eine Kette von Ereignissen angesehen, initiiert durch bakterielle Kolonisation (90). Dieser erste Schritt zur Gewebeanvasion oder Destruktion beginnt mit dem Attachment der Keime an den Epithelien der Wirts-Mucosa (26). Durch das Attachment entziehen sich die Keime den propulsiven Schutzmechanismen. Als Vermittler für ein derartiges Attachment werden biochemische Strukturen der Bakterienoberfläche angesehen (28,46,

57,108). Die Wechselwirkung zwischen Keim und Oberflächen-Epithelien setzt an den Epithelien korrespondierende chemische Strukturen voraus. Für diese vermittelnden Strukturen werden sowohl für die bakterielle als auch für die epitheliale Seite hohe Spezifitäten diskutiert (18,79,80). Dies steht im Einklang mit dem beobachteten Gewebstropismus vieler Keime - so z.B. für Gonokokken zum Urogenitaltrakt, Streptokokken zum Mund- und Rachenraum oder E. coli zum Darm etc. (27,29,71,84); und würde auch erklären, warum spezielle Infektionen meistens von einer bestimmten Bakterienspezies verursacht werden - 80 % der HWI werden durch E. coli verursacht (9,65). Das Attachment an und für sich muß nicht zwangsläufig ein pathogenetischer Faktor einer Infektion sein. Vielerorts im Organismus bedient sich der Körper des Attachments bestimmter Bakterien zur Entwicklung einer sogenannten Normalflora. Diese Normalflora ist eine Art Symbiose, die der Körper mit den Mikroorganismen eingeht und verschafft ihm einen gewissen Schutz gegen das Angehen pathogener Keime. Trotzdem scheint die Virulenz der verschiedenen Bakterien bzw. deren Serotypen mit deren Fähigkeit zu korrelieren, an den Epithelien der ableitenden Harnwege zu haften (106,107). Die Empfänglichkeit für das Attachment pathogener Keime, bzw. die fehlende Fähigkeit, ein derartiges Anhaften zu verhindern, scheint der eigentliche biologische Defekt zu sein oder zumindest die Folge eines solchen Defekts, der die HWI-prädisponierten Patientinnen von denen gegen rekurrierenden Infektionen resistenten unterscheidet. Die Anwesenheit pathogener Keime allein genügt demnach nicht für die Entwicklung einer Infektion (17,74). Eine Prädisposition wird allgemein nicht mehr angezweifelt. Die Neigung mancher Patientin zu rekurrierenden Infektionen hatte dies nahegelegt und eine Reihe von Beobachtungen bekräftigten diese Vermutung. So zeigte sich, daß Einmalkathetern von Kindern mit rekurrierenden HWI häufiger zu einer In-

fektion führte als bei urologisch gesunden Kindern (72). Patienten mit Nierentransplantation bekommen häufiger HWI, wenn die Grundkrankheiten HWI waren (30). Schließlich ist die Gefahr für eine rekurrende Infektion innerhalb von 2 - 3 Monaten nach einer erfolgreichen Antibiotika-Therapie am größten (118). Diese Beobachtung zeigt, daß es wohl gelingt, durch die Behandlung die Bakterien zu eliminieren, daß aber die Disposition, zumindest für eine bestimmte Zeit, bestehen bleibt.

Kein immunologisches Problem!

Auf der Suche nach Prädispositionsfaktoren wurden sowohl spezifische als auch unspezifische Abwehr- und Schutzmechanismen der ableitenden Harnwege untersucht. Experimentell wurde für Serum-Immunglobulin G (Ig G) eine Attachment vermindere Eigenschaft nachgewiesen (16,47,48). Die Untersuchung von HWI-Patienten auf eine evtl. Immundefizienz war jedoch negativ (42,77,85,119). Die humorale Antikörperreaktion (AK) ist intakt (36,58). Die spezifischen AK treten bereits nach der ersten Infektion auf (34) und werden wie bei Gesunden auch, teilweise glomerulär filtriert (34,63). Allerdings kommt allgemein den Serum-Ig im Urin keine besondere Bedeutung zu. Die Urinzusammensetzung und der pH sind für sie nicht optimal (33) und es fehlt eine signifikante Komplementaktivierung (33), da im Urin nicht alle Faktoren dieses Systems vorhanden sind (88). Etwas anders ist es bei den sekretorischen Ig (S-Ig). S-Ig A und G sind besonders geeignet ihre Funktion im variablen Milieu an den Mucosaoberflächen zu erfüllen (23); und auch sie hemmen experimentell das Attachment (24,109,116). Doch war bei HWI-Patienten auch für die S-Ig keine Schwächung der AK-Reaktion nachweisbar (33,35,43). Untersuchungen der zellgebundenen Immunreaktion im schubfreien Intervall führten zu dem glei-

chen Ergebnis (41).

Andere Schutzmechanismen?

Klinische Beobachtungen und Laboruntersuchungen haben gezeigt, daß in die Blase injizierte Bakterien, sowohl bei Versuchstieren, als auch beim Menschen, aus dem Urin eliminiert wurden (12,13,78). Der potenteste Mechanismus hierbei war die mechanische Ausscheidung der Bakterien durch den Harnfluß (Voiding) (4,13,81). Ein Mechanismus, der bei nicht obstruktiven HWI-Patienten ebenfalls intakt ist, wobei zu berücksichtigen ist, daß sich durch ein Attachment an den Zellen dieser Patienten Bakterien dem Spüleffekt des Harnflusses entziehen können (s. o.). Nach der Miktion verbleibende Bakterien könnten eine Infektion perpetuieren, falls ihr Wachstum nicht gehemmt werden würde. Die Beobachtung, daß die Blase steril wird, legt nahe, daß es einen additiven Mechanismus gibt, der mit den verbleibenden Bakterien fertig wird. Den obigen Ergebnissen nach ist dieser Mechanismus nicht im Bereich des Immunsystems zu suchen.

B. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Der Einfluß von Urin bzw. Urinbestandteilen auf das bakterielle Attachment ist wenig untersucht. Für Harnstoff, allerdings in höheren Konzentrationen als man ihn im Urin findet, wurde eine Attachment beeinflussende Wirkung beschrieben (55). Vergleichende Untersuchungen zwischen dem Urin kranker und gesunder Probanden sind bei dieser Fragestellung nicht vorgenommen worden. Bei der Untersuchung von Speichel und dessen Einfluß auf bakterielles Haftungsvermögen an Mundschleimhautepithelzellen ist man etwas weiter.

Gibbons et al. wies für Speichelbestandteile einen Attachment vermindernenden Effekt nach (117). Speichelglykoproteine konnten spezifisch das Attachment eines Streptokokkenstammes an Mundschleimhautepithelien vermindern. Dieser Effekt beruhte auf der Eigenschaft der Glykoproteine, die infizierenden Bakterien zu agglutinieren. Dies wäre auch für Urinbestandteile vorstellbar. Umgekehrt wäre es auch denkbar, daß Urinbestandteile sich an die Attachment vermittelnden Rezeptoren der Mucosazellen binden und so diese maskieren. Der Vorteil dieser Theorie liegt auf der Hand. Die Receptorspezifität der betreffenden Urinbestandteile wäre auf die Epithelien gerichtet und nicht auf die Vielfalt bakterieller Antigene (Ag) oder sonstiger Oberflächenstrukturen.

Unsere Untersuchungen zielen darauf ab, die Wirkung Attachment beeinflussender Faktoren, im Sinne der Gibbons'schen Glykoproteine, oder Zellrezeptoren maskierender Mucoproteine, im Urin nachzuweisen und, vergleichend zwischen dem Urin kranker und gesunder Kinder, das Ausmaß dieser Wirkung zu beurteilen. Die gesammelten 24 Std. Urine testeten wir zur groben Orientierung mit Labstix und mikroskopisch. Anschließend wurden sie eingeeengt und lyophilisiert. Als nächstes untersuchten wir das Agglutinationsvermögen der Lyophilisataufschwemmungen gegen-

über den Testbakterien. Eine quantitative Proteinbestimmung mit den Routinemethoden hämatologischer Labore brachte uns leider keine brauchbaren Werte und konnte aus Materialmangel nicht wiederholt oder durch andere Methoden ersetzt werden. In verschiedenen Ansätzen eines in Vitro Tests betrachteten wir uns den Einfluß der einzelnen Urine auf das bakterielle Attachment und auch die Wirkung auf bereits haftende Mikroorganismen. Schließlich prüften wir das Wachstumsverhalten der Bakterien in den Urinen und führten mit diesen Keimen auch Attachment-Versuche durch.

PATIENTEN - MATERIAL UND METHODEN:

Patienten. Für die dargestellten Untersuchungsvorhaben erhielten wir unsere Testsubstanzen, die Urine, von zwei Spendergruppen zu je vier Mädchen. Die erforderlichen Epithelzellen gewannen wir aus dem Harnsediment einer weiteren Testperson, die keiner der erwähnten Gruppen angehörte.

Bei der ersten Gruppe handelte es sich um vier ambulante Patientinnen aus unserer PN-Sprechstunde. Alle vier hatten eine längere HWI-Anamnese mit mindestens fünf dokumentierten rekurren-
rierenden Infektionen ohne anatomisch röntgenologischem Korrelat. Zum Zeitpunkt der Urinentnahme befanden sie sich alle im schubfreiem Intervall. Als schubfrei klassifizierten wir Patientinnen mit weniger als 1.000 Gram-negativen Enterobakterien/ml Mittelstrahlurin. Die zweite Gruppe bestand aus vier harnwegsgesunden Kindern aus dem Bekanntenkreis. Bei ihnen bestand selbst nach sorgfältigster Anamneseerhebung kein Verdacht auf eine durchlaufene urologische Erkrankung oder Anzeichen für eine floride Infektion.

Unsere Probandinnen waren alle im Alter zwischen 5 und 10 Jahren (Tab. 1), vor der Menarche und ohne Hinweis auf eine Puber-

tas präkox. Eine der Patientinnen war im Laufe ihrer Untersuchungen zystoskopiert worden (Tab. 1). Ansonsten waren bei den Mädchen keine Punktionen, Biopsien oder sonstige Operationen an den Nieren oder ableitenden Harnwegen durchgeführt worden. Alle befanden sich bis zu einem angemessenem Zeitraum vor der jeweiligen Entnahme - mindestens 5 Tage - nicht unter Antibiotika-Therapie oder Prophylaxe.

Pat.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Alter J.	9	6	7	10	9	7	7	9	5
Zytoskopie	-	-	-	+	-	-	-	-	-

Tab.1: Alter der Probandinnen; Zytoskopie.

Pat. 1 - 4 = Krank

Pat. 5 - 8 = Gesund

Pat. 9 = Zellspenderin

Material.

Der Urin. Von jeder Urinspenderin verwendeten wir einen 24 Std. Urin. Die Mädchen und deren Mütter waren angehalten vor jeder Miktioñ, bei gespreizten Labien, das äußere Urethralostium und das Vestibulum von vorne nach hinten zu säubern.

Während der Sammelperiode verhinderten wir das Bakterienwachstum von Kontaminationskeimen durch Zusatz von Na-Azid (0,15 g/ 24 h Urin). Jeder Urin wurde vor dem Zusatz von Na-Azid mit Labstix und später mikroskopisch untersucht. Blut, Ketonkörper, Glukose und Eiweiß waren stets negativ. Die pH-Werte wurden registriert (Tab. 2). Die mikroskopischen Befunde waren stets unauffällig (Tab. 2). Möglichst bald nach Abschluß der Sammelperiode zentrifugierten wir den Urin (10 min bei 2.000 U/min). Das Sediment wurde nach zweimaligem Waschen durch Zentrifu-

gation mit PBS (phosphat-buffered-saline, einem Phosphatpuffer, 0,01 M, pH 7,1) verworfen. Der Urinüberstand, zusammen mit den PBS-Überständen der zwei Waschungen, wurde bei 4°C durch Ultrafiltration auf ca. 80 ml eingengt. Ultrafiltration schien uns die schonendste Methode zur Einengung bei Erhalt eventueller biologischer Aktivitäten zu sein. Wir verwendeten hierzu eine Amicon Ultrafiltrationszelle Mod 202 mit Diaflo Membranen Typ UM 05. Die molekulare Trennungsgrenze dieser Membranen liegt bei 500 MG. Wir filterten unter Magnetquirlung mit Stickstoff bei einem Druck von 5 Atü.

Pat. ^o		Blut	Keton	Eiweiß	Glukose	pH	 Bakterien
1		-	-	-	-	7	-
2		-	-	-	-	6	-
3		-	-	-	-	6	-
4		-	-	-	-	6	-
5		-	-	-	-	6	-
6		-	-	-	-	6	-
7		-	-	-	-	6	-
8		-	-	-	-	6	-
9 ^o		-	-	-	-	6	-

Tab.2: Labstix-Test und Mikroskopie.

An allen Versuchstagen

Der eingeeengte Urin wurde anschließend bei - 80°C in Glaspetrischalen bei einer Schichtdicke von etwa 1 cm eingefroren und gefriergetrocknet. Das so erhaltene Pulver wurde nach nochmaligem Nachtrocknen möglichst luftdicht verwahrt. Bei jedem

Versuch stellten wir uns die Urinpulveraufschwemmungen mit PBS frisch her. Die Konzentration entsprach hierbei in jedem Ansatz einem physiologischem Urinmilieu, errechnet aus dem Mittel der Urin : Urinpulver Verhältnisse (Tab. 3). Zur Erlangung dieser Konzentration von 7 mg/ml in den Teströhrchen stellten wir uns von jedem Lyophilisat eine Suspension von 35 mg/ml her, von der wir, bei einem Gesamtansatzvolumen von 0,5 ml, jeweils 0,1 ml verwendeten (Abb. 1). Für weitere, konzentriertere Urinansätze reichte unser Material leider nicht. Für die Vorbehandlung der Bakterien und Zellen in den entsprechenden Versuchen benützten wir auch die Konzentration von 7 mg/ml Urinpulver.

Pat.	Urin ml.	Pulver g.	mg/ml.	m mg/ml.
1	870	3,79	4,35	
2	300	2,29	7,63	
3	300	2,42	8,06	
4	1150	9,26	8,05	
5	650	2,52	3,87	7,00
6	600	2,88	4,80	
7	370	4,31	11,65	
8	750	5,69	4,36	

Tab.3: Urin- und Lyophilisat-Mengen.

Die Zellen. An jedem Versuchstag gewannen wir die Epithelzellen aus dem Urinsediment eines frischen Morgenurins unserer Zellspenderin. Hier verwendeten wir kein Na-Azid. Der Urin wurde auch jeweils mit Labstix und mikroskopisch untersucht (Tab. 2) und später verworfen.

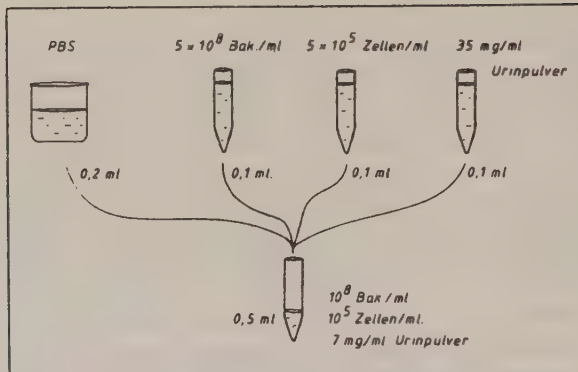


Abb.1: Die Testansätze.
Konzentrationen und Mengen.

Ein derart durch Zentrifugation gewonnenes Urinsediment beinhaltet eine heterogene Population von Epithelien der oberen und unteren Harnwege, deren Verhältnis von Spender zu Spender und von Tag zu Tag variiert (53,102,104,105). Da das Attachement unter den einzelnen Zelltypen jedoch nur um 3 % variiert (105), unterschieden wir sie nicht weiter. Die toten Zellen konnten später durch anfärben mit Trypanblau erkannt werden (54).

Die Zellen wurden nun solange mit PBS gewaschen, bis der Überstand klar wurde. Im Durchschnitt 2 - 3 mal. Anschließend wurden sie in PBS resuspendiert und ihre Zahl/ml in einer Neubauer-Zählkammer mikroskopisch bestimmt. Die Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml erhielten wir durch entsprechende Verdünnung. Von dieser Suspension benötigten wir je Röhrchen 0,1 ml um schließlich die gewünschte Menge von 10^5 Zellen/ml in den

Attachment-Ansätzen zu haben (Abb. 1). Bei den Versuchen mit vorbehandelten Zellen inkubierten wir 1 ml der Zellsuspension zuvor mit dem gleichen Volumen der einzelnen, standardisierten Urinlösungen und 3 ml PBS (1 h, bei 37°C auf dem Rüttler).

Die Bakterien. Für alle unsere Versuche verwendeten wir den gleichen E. coli-Stamm. Es handelte sich hierbei um einen als T₁ bezeichneten E. coli-Referenzstamm, der als besonders attachmentfreudig gilt und den wir aus Göteborg zugesandt bekamen. Die Kulturen wurden durch wöchentliche Umtransferierung auf Blutagarplatten erhalten.

Für jeden Versuchstag wurde eine Bakterienkolonie von einer Blutagarplatte auf ein flüssiges Nährmedium übertragen und über Nacht (16 h) bei 37°C bebrütet. Als Nährmedium für diese Übernachtskultur verwendeten wir 3 ml BHI (brain-heart-infusion-broth, Difco Laboratorien). Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (10 min. bei 2.000 U/min) gesammelt und in PBS resuspendiert. Die Keimzahl/ml bestimmten wir mikroskopisch in einer Zählkammer. Durch entsprechende Verdünnung stellten wir uns eine Suspension mit einer Keimzahl von 5×10^8 Bakterien/ml her. Um in den Attachment-Ansätzen die gewünschte Konzentration von 10^8 Bakterien/ml zu erhalten, benötigten wir von dieser Suspension jeweils 0,1 ml (Abb. 1). Bei den Versuchen mit vorbehandelten Bakterien wurden diese zuvor in der standardisierten Suspension mit einem äquivalentem Volumen der Lyophilisate und dem dreifachem Volumen PBS inkubiert (1 h, bei 37°C auf dem Rüttler).

Methoden.

Keimzahlbestimmung im Mittelstrahlurin. Als schubfrei klassifizierten wir unsere HWI-Patientinnen bei weniger als 1.000 Gram-negativer Keime/ml Mittelstrahlurin. Die Keimzahl bestimmten wir wie folgt:

0,1 ml eines frischen Mittelstrahlurins verdünnten wir mit

4,9 ml steriler NaCl-Lösung (0,9 %ig; $\approx 1 : 50$). Von dieser Verdünnung wurden jeweils 0,05 ml mit einer Pipette auf die Hälfte einer Blut- und einer ENDO-Agarplatte gleichmäßig aufgetragen. Für eine evtl. Keimbestimmung beimpften wir die andere Hälfte beider Platten durch Ausstreichen einer Öse mit einem Tropfen unverdünntem Urin (Abb. 2). Die Platten wurden anschließend über Nacht bei 37°C bebrütet. Jede Kolonie in den mit verdünntem Urin beimpften Plattenhälften hätte einer Keimzahl von 1.000 Bakterien/ml Mittelstrahlurin entsprochen.

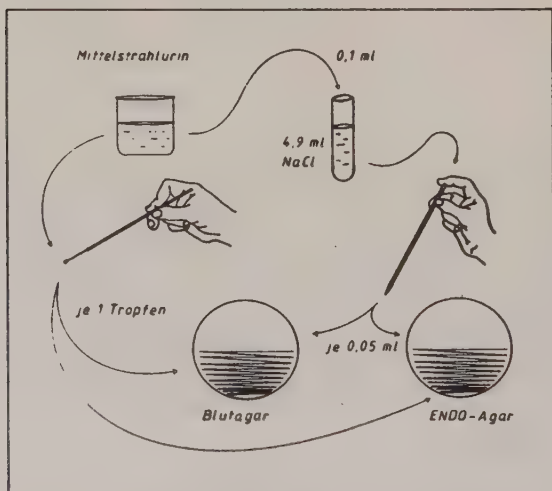


Abb.2: Keimzahlbestimmung im Mittelstrahlurin.

In Vitro Attachment- und Desorption-Test.

Getestet wurde der Einfluß von Urin auf Attachment und Desorption, vergleichend zwischen den Substanzen von vier gesunden und vier HWI-disponierten Mädchen. Als Bezugsgröße diente ein jeweils mitgeführter Attachment- und Desorption-Ansatz in PBS. (Tab. 4).

Die Attachment-Tests in den verschiedenen Milieus und mit den einzelnen Vorbehandlungen für Bakterien und Zellen, führten wir mit einer leicht modifizierten Methode nach C. Svanborg Eden et al. durch (104,105,106). In ihren Versuchen hat diese Arbeitsgruppe die Bedingungen zur Durchführung eines in-Vitro-Attachment-Tests optimiert. Bei der Vorbehandlung von Bakterien und Zellen handelte es sich um eine Vorinkubation standardisierter Mengen in äquivalente Volumina der einzelnen Lyophilisataufschwemmungen.

Wir unterschieden bei unseren Versuchen zunächst drei Test-Reihen. In der ersten Reihe verwendeten wir unvorbehandelte Bakterien und Zellen. In den weiteren zwei Reihen wurden einmal die Zellen und einmal die Bakterien vorbehandelt. Alle Tests wurden parallel dreifach ausgeführt. Der erste Ansatz diente der Attachment-Beurteilung, während die anderen zwei, nach Reinkubation in PBS bzw. Urin, zur Beurteilung der Desorption dienten. Später ergänzten wir eine weitere Testreihe, bei der wir vorbehandelte Bakterien und Zellen gleichzeitig verwendeten. Hier allerdings prüften wir die Desorption nicht.

Attachment in PBS und Urin. Für das Attachment in PBS wurden 0,1 ml der E. coli-Suspension mit 0,1 ml der Zellsuspension und 0,3 ml PBS für eine Stunde bei 37° C auf dem Rüttler inkubiert (Tab. 4). Für das Attachment in Urin verwendeten wir die gleichen Mengen der Bakterien- und Zell-Suspensionen, jedoch nur 0,2 ml PBS und 0,1 ml der jeweiligen Test-Urine (Tab. 4). Nach der Inkubation wurden die nicht an den Epithelien haftenden Keime durch zweimaliges Zentrifugieren mit PBS

weitgehendst im Überstand abgesaugt. Die noch im Sediment verbliebenen, nicht adhärlierten Bakterien wurden durch Zugabe von einem Tropfen Glutaraldehyd inaktiviert und so deren nachträgliches Attachment verhindert. Schließlich wurden bei jedem Ansatz für 40 Epithelien die Zahl der haftenden Keime mikroskopisch bestimmt. Durch Anfärben mit Trypanblau waren die toten Zellen erkennbar (54) und wurden nicht mit ausgewertet.

Angaben in ml.	Attachment in PBS		Attachment in Urin		Attachment in PBS		Attachment in Urin		Attachment in PBS		Attachment in Urin	
	Desorption in PBS		Desorption in PBS		Desorption in Urin		Desorption in PBS		Desorption in Urin		Desorption in Urin	
Bakterien	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Zellen	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
PBS	0,3	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2
Urin	-	0,1	-	0,1	-	0,1	-	0,1	-	0,1	-	0,1
	← reinkubieren →											
PBS					0,5	0,5	0,4	0,4	0,5	0,5	0,4	0,4
Urin					-	-	0,1	0,1	-	-	0,1	0,1
	← waschen; fixieren; färben →											

Tab.4: Ansätze für Attachment und Desorption.

Desorption durch Reinkubation in PBS und Urin. Bei unseren Desorption-Versuchen gingen wir davon aus, daß in Vivo die Bakterien, wenn überhaupt, so unter den gleichen Milieu-Einflüssen losgelöst werden würden, unter denen sie sich an den Epithelien anhafteten. Daher wählten wir die Reinkubation als Desorption-

Ansatz. Die mechanische Komponente des Urinflusses ist bei den in-Vitro-Attachment und Desorption-Tests gleichermaßen nicht berücksichtigt. Die für die Desorption-Versuche parallel mitgeführten Attachment-Ansätze wurden nach dem Absaugen der nicht adhärennten Keime im Überstand noch weiterbearbeitet. Der Effekt des Urins auf die bereits haftenden Keime wurde durch Reinkubation getestet. Dafür wurde das Sediment in 0,4 ml PBS und 0,1 ml der Urinpulverlösungen resuspendiert und für eine weitere Stunde bei 37°C auf dem Rüttler inkubiert (Tab. 4). Für die Desorption in PBS resuspendierten wir in 0,5 ml PBS (Tab. 4). Nach der Entfernung der gelösten Keime durch Zentrifugation wurde das Sediment auch hier fixiert und gefärbt. Anschließend wurde die Zahl der noch haftenden Keime bestimmt.

Bakterienwachstum in Urin-Milieu. Wir überimpften eine Kolonie unseres Bakterienstammes von einer Blutagarplatte auf 3 ml eines flüssigen Nährmediums (BHI). In diesem Nährmedium wurden die Bakterien nun 6 h bei 37°C vorgezüchtet. Zu diesem Zeitpunkt hatten sie längst ihre logarithmische Wachstumsphase erreicht und sich zahlreich vermehrt (Abb. 3). Nach den 6 h wurden die Bakterien abzentrifugiert, in PBS resuspendiert und mikroskopisch ihre Konzentration/ml bestimmt. Anschließend wurden jeweils 10^4 Bakterien in 1 ml der Testurine gegeben und für weitere 16 h ebenfalls bei 37°C bebrütet. Eine BHI-Kontrolle ließen wir parallel dazu mitwachsen. Dann wurde nochmals mikroskopisch die Konzentration/ml bestimmt.

Attachment in PBS mit in Urin gezüchteten Keimen. Mit den in Urin gezüchteten Keimen führten wir ebenfalls einen Attachment-Versuch in PBS durch. Wir stellten uns hierfür Suspensionen von 5×10^8 Bakterien/ml her und gaben zu 0,1 ml dieser Suspension noch 0,1 ml der Zellsuspension und 0,3 ml PBS. Der weitere Ablauf ist bekannt. Einen Desorption-Test führten wir hier nicht durch.

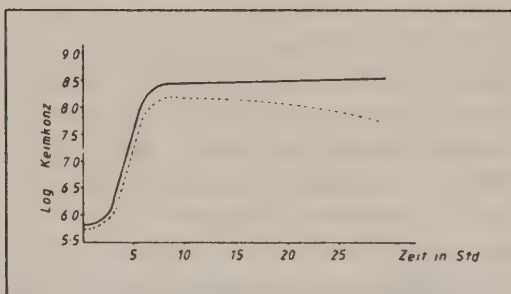


Abb. 3: Logarithmische Wachstumskurve der Bakterien im Nährmedium.

Agglutinationsvermögen von Urin auf T_1 E. coli O- und H-AG.

Wir untersuchten das Agglutinationsvermögen von Urin auf T_1 E. coli O- und H-AG mit Hilfe einer im Reagenzglas durchgeführten quantitativdiagnostischen Agglutinationsreaktion nach Gruber - Widal.

Antigenherstellung. (Abb. 4). O-AG-Suspensionen werden durch Kultur auf trockenem Agar, H-AG-Suspensionen durch Züchtung in Nährbouillon gewonnen (32). Wir beimpften 5 Standard I Nähragarplatten (Merck) dicht mit T_1 E. coli Reinkulturen und 5 Reagenzröhrchen à 4 ml Standard I Nährbouillon (Merck) mit je einer Kolonie des gleichen Stammes. Platten und Röhrchen wurden über Nacht bei 37°C bebrütet. Von den Platten ernteten wir die Keime durch Abstreifen mittels eines Watteträgers und 5 ml NaCl/Platte. In den Röhrchen ernteten wir durch Zentrifugation und resuspendierten den Niederschlag nach Dekantieren des Überstands in NaCl. Für die O-AG-Gewinnung wurden die auf den Platten gezüchteten Keime nun für 1 h bei 121°C autoklaviert, anschließend zentrifugiert und mittels photometrischer Messungen in die übliche Gebrauchsverdünnung mit NaCl gebracht.

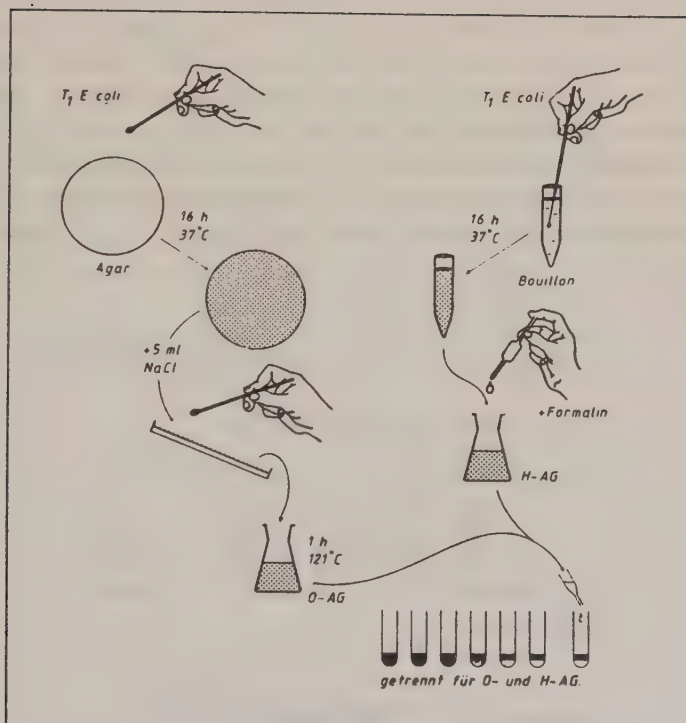


Abb.4: Antigenherstellung.

Zur Gewinnung von H-AG wurden die in Bouillon gezüchteten Keime durch Zusatz von 0,5 % Formalin (Endverdünnung) abgetötet. Auch hier wurde anschließend zentrifugiert und mittels Photometer die Gebrauchsverdünnung mit NaCl erstellt.

Gruber - Widal Agglutinationstest. (Abb. 5). Wir erstellten mit den Lyophilisat Aufschwemmungen der Patienten-Urine in Reagenzröhrchen halbwertige Verdünnungsreihen, beginnend mit einer Konzentration von 70 mg/ml. Dieser Wert entsprach dem 10-fachem

unserer sonst verwendeten Konzentration. Die Konzentration von 7 mg/ml ist in den Verdünnungsreihen jeweils nach dem dritten Röhrchen erreicht. Wir arbeiteten mit Urin- und AG-Mengen von je 0,5 ml. Den zuerst hergestellten Urinverdünnungen wird die gleiche Menge gebrauchsfertigen Antigens beigegeben, das Ganze wird gut gemischt und für O-AG 18 h, für H-AG nur 2 h bei 50° C im Wasserbad inkubiert. Bei der Ablesung wird festgestellt, bis zu welcher Urinverdünnung eine Agglutination erfolgt ist. Als Verdünnungswert wird immer die nach Zugabe des AG bestehende

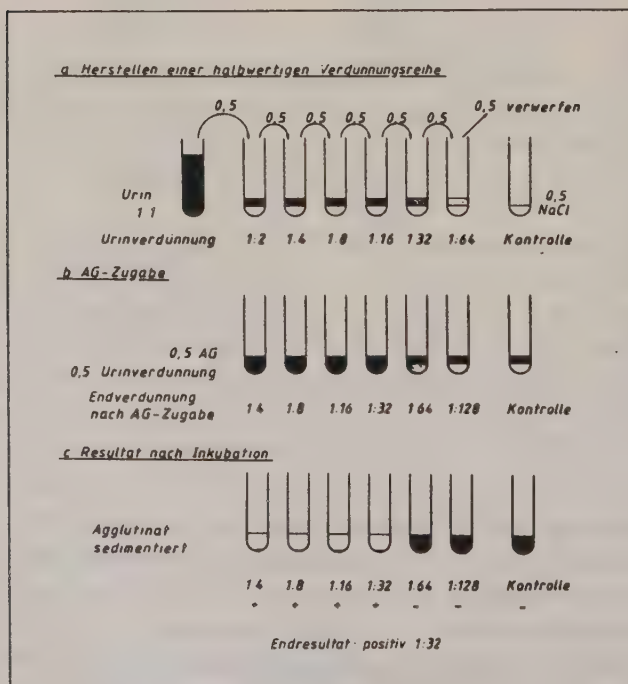


Abb.5: Gruber - Widal Agglutinationstest.

Gesamtverdünnung gerechnet. Die Titerangabe bezieht sich auf die letzte Verdünnung, bei der noch eine Agglutination stattfand.

Bei einer O-Agglutination bilden sich feine, körnchenartige Gebilde aus (körnige Agglutination), die unter Klärung der Flüssigkeit zu Boden sinken und dort zu einer Haut verkleben, die bei leichtem Beklopfen des Glases in kleine Fetzen oder Bröckchen, bei starkem Schütteln in kleine Körnchen zerfällt. Bei H-Agglutination zeigen sich flockige Gebilde (flockige Agglutination), die bei längerem Stehen als wolkig weicher Bodensatz die Röhrchenkuppe ausfüllen und sich durch leichtes Schütteln wieder in der Flüssigkeit verteilen lassen (32).

C. ERGEBNISSE:

Die auf den Epithelien haftenden Bakterien waren bei allen Attachment- und Desorption-Tests unter dem Lichtmikroskop gut zu erkennen und wurden auch so gezählt. Hafteten viele Keime, so konfluieren sie auf den Zelloberflächen und ihre Anzahl konnte nur grob bestimmt werden. (Abbildung A zeigt bakterienbeladene Epithelien). Auf diese Weise wurden jeweils für 40 Zellen die haftenden Bakterien bestimmt und der Mittelwert ($\bar{m}$) errechnet. In den Tabellen verwendeten wir zur übersichtlicheren Darstellung nur $\bar{m}$. Biomathematische Betrachtungen haben wir in einem gesondertem Kapitel zusammengestellt.

Einfluß der verschiedenen Vorbehandlungsarten auf das Attachment in PBS. Eine mögliche Attachment beeinflussende Wirkung von Urinbestandteilen prüften wir vergleichend zwischen Urin von Kranken und Gesunden. Dabei unterschieden wir 4 Test-Reihen. In der ersten Test-Reihe verwendeten wir unvorbehandelte Zellen und Bakterien. In den weiteren 3 Reihen wurden einmal die Bakterien, einmal die Zellen und später beides, Bakterien und Zellen, mit den einzelnen Urinen vorbehandelt.

Vergleichen wir das Attachment in PBS dieser vier Vorbehandlungsarten, so zeigt sich, daß sowohl die alleinige Vorbehandlung der Bakterien, als auch die der Zellen mit den jeweiligen Test-Urinen, das bakterielle Attachment deutlich vermindert (Tab. 5 a +). Beide Vorbehandlungsarten hatten in etwa den gleichen Einfluß. Betrachten wir uns die entsprechenden Ergebnisse der 4. Test-Reihe, bei der wir nun eine noch deutlichere Attachment-Ver minderung erwarteten, so zeigt sich jedoch eine Attachment-Steigerung gegenüber den Versuchen ohne Vorbehandlung (Tab. 5 b +). Dieses letzte Ergebnis ist

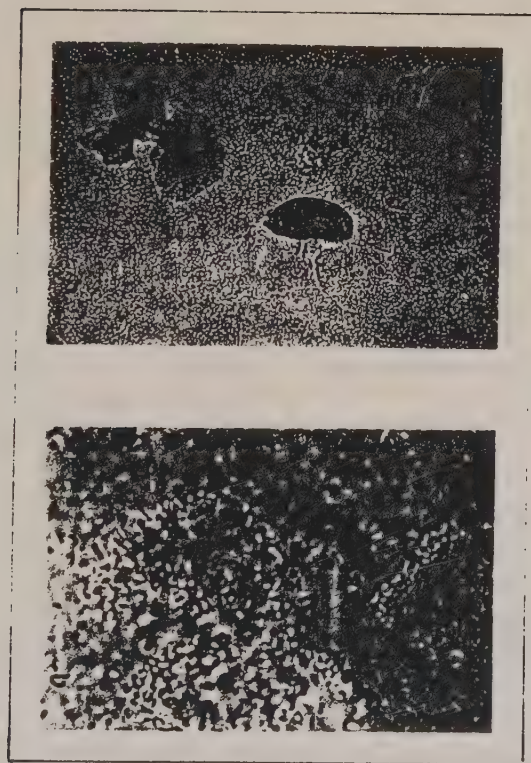


Abb. A: Bakterienbeladene Epithelien.

schwer interpretierbar und paßt auch nicht in die Tendenz, die sich zuvor abzeichnete. Wir vermuten, daß die Ergebnisse der 4. Test-Reihe, aufgrund der längeren Urinpulverlagerung, nicht ohne weiteres mit denen der anderen Reihen vergleichbar sind. Daher wollen wir sie bei der Interpretierung eher vernachlässigen. - Wie bereits erwähnt, wurde die 4. Test-Reihe erst nach Auswertung der anderen Reihen erstellt. Zwischen der Verwendung von Urin kranker oder gesunder Mädchen bei der Vorbehandlung, ist bei allen Versuchen, bei denen eine Vorbehandlung stattfand, eine Neigung zu höherem Attachment bei der Verwendung von Urin gesunder Kinder zu beobachten (Tab. 5 a → u. 5 b →).

Vorbehandelt in Urin von Pat.	1	2	3	4	$\bar{m}$	5	6	7	8	$\bar{m}$
unvorbehandelt	14,2	15,0	14,2	14,2	14,4	14,2	14,2	14,2	30,6	18,3
Bakterien vorbehandelt	4,8	5,4	5,5	6,4	5,5	5,5	16,9	4,1	7,4	8,5
Zellen vorbehandelt	8,4	7,0	3,6	4,7	5,9	5,6	13,0	8,9	3,9	7,9

Tab.5a: Attachment in PBS (Bakterien/Zelle);

↓ Einfluß der alleinigen Vorbehandlung von Bakterien bzw. Zellen auf das Attachment in PBS.

→ Vergleich zwischen der Verwendung von Urin Kranker und dem Gesunder bei der Vorbehandlung.

Vorbehandelt in Urin von Pat.	1	2	3	4	$\bar{m}$	5	6	7	8	$\bar{m}$
unvorbehandelt	14,2	15,0	14,2	14,2	14,4	14,2	14,2	14,2	30,6	18,3
Bak. & Zellen vorbehandelt	14,9	25,9	22,3	21,8	21,2	27,4	39,5	23,5	20,3	27,7

Tab.5b: Attachment in PBS (Bakterien/Zelle)

↓ Einfluß der gleichzeitigen Vorbehandlung von Bakterien und Zellen auf das Attachment in PBS.

→ Vergleich zwischen der Verwendung von Urin Kranker und dem Gesunder bei der Vorbehandlung.

Das Bakterienwachstum in Urin. Das Bakterienwachstum in den Test-Urinen ist im Verhältnis zu dem Wachstum in BHI geringer. Die im Urin gesunder Kinder gezüchteten Keime wachsen etwas schlechter als die im Urin kranker (Tab. 6). Für die Attachment-Versuche mit diesen in Urin gezüchteten Keimen verwendeten wir dennoch die gleichen Bakterienkonzentrationen wie sonst auch.

Bakterienwachstum in Urin von Pat.	BHI	1	2	3	4	$\bar{m}$	5	6	7	8	$\bar{m}$
Bak/ml. $\times 10^8$	3,7	1,4	1,4	1,6	1,3	1,4	1,2	1,1	1,2	0,9	1,1

Tab.6: Das Bakterienwachstum in Urin.
(beachte Faktor 10^8).

Einfluß der Bakterienzüchtung in Urin auf das Attachment in PBS. In einem weiteren Versuch führten wir das Attachment in PBS mit Keimen durch, die wir zuvor in den verschiedenen Urinen herangezüchtet hatten. Ansonsten waren die Bedingungen wie bei der unvorbehandelten Test-Reihe. Das Attachment war hier gegenüber dem der in BHI gezüchteten Bakterien nicht wesentlich verändert (Tab. 7). Es zeigte sich jedoch eine leichte Tendenz zu höherem Attachment bei den im Urin Gesunder gezüchteten Bakterien.

Bak. gezüchtet in Urin von Pat.	1	2	3	4	$\bar{m}$	5	6	7	8	$\bar{m}$
Bak. gezüchtet in BHI	14,2	15,0	14,2	14,2	14,4	14,2	14,2	14,2	30,6	18,3
Bak. gezüchtet in Urin	11,6	12,0	10,4	13,5	11,9	18,1	25,5	13,9	12,9	17,6

Tab.7: Attachment in PBS mit in Urin gezüchteten Keimen.

Einfluß der verschiedenen Vorbehandlungsarten auf das Attachment in Urin. Parallel zu den Versuchen in PBS führten wir das Attachment mit T₁ E. coli an Uroepithelien auch in den Urin-Milieus der einzelnen Urinspenderinnen durch. Die vier Vorbehandlungsarten behielten wir bei. Der Einfluß der verschiedenen Vorbehandlungsarten bei Attachment in Urin ist ähnlich dem bei Attachment in PBS. Behandelte man nur die Zellen oder Bakterien vor, so war das Attachment in beiden Fällen gleichermaßen niedriger als bei dem Versuch ohne Vorbehandlung (Tab. 8 a ↓). Bei der 4. Versuchsreihe, wo Bakterien und Zellen gleichzeitig vorbehandelt wurden, waren die Attachment-Werte höher als bei der unvorbehandelten Reihe (Tab. 8 b ↓). Auch dieses Ergebnis dieser Reihe wollen wir - aus den gleichen Gründen wie zuvor bei dem Versuch in PBS - mit Vorsicht betrachten.

Je nachdem, ob wir Urin von Kranken oder Gesunden zur Vorbehandlung verwendeten, waren die Wirkungen unterschiedlich. Bei Vorinkubation in dem Urin gesunder Mädchen waren die Attachment-Werte höher (Tab. 8 a → u. 8 b →). Dieser Unterschied ist hier deutlicher als zuvor in PBS, da die Wirkungen von Vorinkubation und Attachment, jeweils im Urin der gleichen Probandin, sich addieren.

Vorbehandelt in Urin von Pat.	1	2	3	4	$\bar{m}$	5	6	7	8	$\bar{m}$
unvorbehandelt	32,0	30,0	18,7	24,9	26,4	55,0	35,1	34,9	56,9	45,5
Bakterien vorbehandelt	19,6	12,9	11,1	22,8	16,6	14,3	38,6	18,9	12,1	21,0
Zellen vorbehandelt	22,9	34,1	17,1	9,5	20,9	29,4	30,9	19,4	11,4	22,8

Tab. 8 a: Attachment in Urin (Bakterien/Zelle);

↓ Einfluß der alleinigen Vorbehandlung von Bakterien bzw. Zellen auf das Attachment in Urin.

→ Vergleich zwischen der Verwendung von Urin Kranker und dem Gesunder bei der Vorbehandlung.

Attachment in Urin gegenüber dem in PBS. Wir wollen nun innerhalb der einzelnen Vorbehandlungsarten das Attachment in Urin mit dem in PBS vergleichen.

Unabhängig von der Vorbehandlungsart sind die Zahlen der haftenden Keime in den Urinansätzen meist um mehr als das Doppelte, im Einzelfall bis zum Fünffachen höher als in den PBS-Ansätzen (Tab. 9 ↓). Ein Vergleich über die Wirkung von Urin kranker und gesunder Kinder als Attachment-Milieu, zeigt, ebenfalls unabhängig von der Vorbehandlungsart, eine leichte, aber beständige Tendenz zu höherem Attachment im Milieu gesunder Kinder (Tab. 9 →).

Desorption von in PBS angehafteten Keimen durch Reinkubation in PBS oder Urin. Die bei unvorbehandelten Bakterien und Zellen angehafteten Keime ließen sich bei Reinkubation in PBS zum Teil abspülen. Bei Reinkubation in Urin war dieser Spüleffekt nicht erkennbar (Tab. 10 a ↓). Es spielte hierbei keine Rolle, ob in Urin von Kranken oder in dem von Gesunden reinkubiert wurde (Tab. 10 a →). Führten wir diesen Versuch mit Keimen durch, die wir vor dem Attachment vorbehandelt hatten, so zeigte sich in etwa das gleiche Ergebnis (Tab. 10 b ↓ u. →). Anders bei Vorbehandlung der Zellen. Die Desorption bei Reinkubation in PBS war hier nicht zu erkennen und bei der Spülung in Urin stieg sogar die Zahl der adhärrierenden Keime (Tab. 10 c ↓). Ein Unterschied in der Urinwirkung zwischen krank und gesund ist nicht erkennbar (Tab. 10 c →).

Urin von Pat.	1	2	3	4	$\bar{m}$	5	6	7	8	$\bar{m}$
<u>unvorbehandelt</u>										
Att. in PBS	14,2	15,0	14,2	14,2	14,4	14,2	14,2	14,2	30,6	18,3
Att. in Urin	32,0	30,0	18,7	24,9	26,4	55,0	35,1	34,9	56,9	45,5
<u>Bakterien</u>										
<u>vorbehandelt</u>										
Att. in PBS	4,8	5,4	5,5	6,4	5,5	5,5	16,9	4,1	7,4	8,5
Att. in Urin	19,6	12,9	11,1	22,8	16,6	14,3	38,6	18,9	12,1	21,0
<u>Zellen</u>										
<u>vorbehandelt</u>										
Att. in PBS	8,4	7,0	3,6	4,7	5,9	5,6	13,0	8,9	3,9	7,9
Att. in Urin	22,9	34,1	17,1	9,5	20,9	29,4	30,9	19,4	11,4	22,8
<u>Bak. & Zellen</u>										
<u>vorbehandelt</u>										
Att. in PBS	14,9	25,9	22,3	21,8	21,2	27,4	39,5	23,5	20,3	27,7
Att. in Urin	42,6	53,8	33,4	54,1	46,0	55,3	67,3	47,1	46,1	54,0

Tab.9: Attachment in PBS verglichen mit dem in Urin.

→ Vergleich zwischen der Verwendung von Urin Kranker und dem Gesunder als Attachment-Milieu.

Urin von Pat.	1	2	3	4	$\bar{m}$	5	6	7	8	$\bar{m}$
a)										
<u>unvorbehandelt</u>										
Att. in PBS	14,2	15,0	14,2	14,2	14,4	14,2	14,2	14,2	30,6	18,3
PBS/PBS	9,2	9,5	9,2	9,2	9,3	9,2	9,2	9,2	10,3	9,5
PBS/Urin	8,9	14,3	16,9	8,4	12,1	16,9	9,5	14,9	19,9	15,3
b)										
<u>Bakterien</u>										
<u>vorbehandelt</u>										
Att. in PBS	4,8	5,4	5,5	6,4	5,5	5,5	16,9	4,1	7,4	8,5
PBS/PBS	1,9	4,8	3,3	2,0	3,0	2,3	11,1	1,1	4,4	4,7
PBS/Urin	2,5	5,6	5,6	3,3	4,3	7,3	13,6	7,8	8,1	9,2
c)										
<u>Zellen</u>										
<u>vorbehandelt</u>										
Att. in PBS	8,4	7,0	3,6	4,7	5,9	5,6	13,0	8,9	3,9	7,9
PBS/PBS	5,3	7,8	5,2	7,1	6,4	4,0	8,9	6,3	3,1	5,6
PBS/Urin	5,9	22,5	10,5	7,9	11,7	5,8	19,1	6,8	12,3	11,0

Tab.10 a-c: ↓ Desorption von in PBS angehafteten Keimen durch Reinkubation in PBS oder Urin.

→ Vergleich zwischen der Verwendung von Urin Kranker und dem Gesunder für den Desorption-Test.

Desorption von in Urin angehafteten Keimen durch Reinkubation in PBS oder Urin. Die Desorption-Versuche führten wir auch für Keime durch, die wir im Urin-Milieu an den Epithelien adhärirt hatten und erhielten hierbei in etwa die gleichen Ergebnisse. Unabhängig von der Vorbehandlungsart führte die Reinkubation in PBS zur Ablösung haftender Keime. Reinkubation in Urin zeigte keinen Wegspüleffekt (Tab. 11 ↓).

Für die Desorption in Urin zeigte sich kein Unterschied zwischen der Auswirkung von Urin Kranker und dem Gesunder (Tab. 11 →).

Die Reinkubationsversuche für die Reihe mit vorbehandelten Bakterien und Zellen haben wir nicht durchgeführt.

Urin von Pat.	1	2	3	4	$\bar{m}$	5	6	7	8	$\bar{m}$
a)										
<u>unvorbehandelt</u>										
Att. in Urin	32,0	30,0	18,7	24,9	26,4	55,0	35,1	34,9	56,9	45,5
Urin/PBS	21,5	17,0	16,9	17,6	18,3	37,1	14,8	17,5	33,8	25,8
Urin/Urin	22,3	27,6	22,8	25,1	24,5	51,4	32,8	8,6	41,1	33,5
b)										
<u>Bakterien</u> <u>vorbehandelt</u>										
Att. in Urin	19,6	12,9	11,1	22,8	16,6	14,3	38,6	18,9	12,1	21,0
Urin/PBS	9,8	8,9	9,3	9,4	9,4	12,1	14,4	4,9	5,2	9,2
Urin/Urin	18,6	23,6	28,4	13,8	21,1	30,0	35,4	21,0	14,3	25,2
c)										
<u>Zellen</u> <u>vorbehandelt</u>										
Att. in Urin	22,9	34,1	17,1	9,5	20,9	29,4	30,9	19,4	11,4	22,8
Urin/PBS	15,6	17,4	6,5	4,6	11,0	11,8	15,9	13,5	10,7	13,0
Urin/Urin	16,4	47,9	5,3	11,9	20,4	25,8	39,8	24,6	15,0	26,3

Tab. 11a-c: ↓ Desorption von in Urin angehafteten Keimen durch Reinkubation in PBS oder Urin.
→ Vergleich zwischen der Verwendung von Urin Kranker und dem Gesunder für den Desorption-Test.

Agglutinationsvermögen von Urin auf T1 E. coli O- und H-Antigene. Bis zu einer Titerhöhe von 1 : 4 bzw. 1 : 8 waren alle Lyophilisataufschwemmungen in der Lage, unseren Bakterienstamm zu agglutinieren (Tab. 12). Den Ergebnissen ist kein Unterschied zwischen der Wirkung von Urin gesunder und kranker Probanden zu entnehmen. Bei der verwendeten Ausgangskonzentration von 70 mg/ml Urinpulver ist erst bei einem Titer von 1 : 32 die Lyophilisatkonzentration erreicht, die wir auch für unsere Attachment-Tests verwendeten. Einflüsse von Urin auf das Attachment sind demnach hier nicht auf das Agglutinationsvermögen der Urine gegenüber den Bakterien zurück-

zuführen.

Urin von Pat.	1	2	3	4	5	6	7	8
O-Antigen	1:8	1:8	1:4	1:8	1:8	1:4	1:4	1:8
H-Antigen	1:8	1:8	1:4	1:4	1:8	1:8	1:8	1:8

Tab. 12: Agglutinationsvermögen von Urin auf T_1 *E. coli* O- und H-Antigene.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

In den verwendeten Konzentrationen waren die Urine nicht in der Lage, die Test-Bakterien zu agglutinieren. Bezüglich des Agglutinationsvermögens bei höheren Konzentrationen der Urinpulverlösungen war kein Unterschied zwischen der Wirkung von Urin kranker und dem gesunder Probanden ersichtlich. Unabhängig von der Vorbehandlungsart war das Attachment der Bakterien an den Epithelien der ableitenden Harnwege in Urin-Milieu stets höher als in PBS und bei Verwendung von Urin gesunder Probanden höher als bei dem kranker. Sowohl die alleinige Vorbehandlung der Bakterien, als auch die der Zellen verminderte das bakterielle Attachment in PBS und Urin. Diese Attachment-Verminderung war bei Vorbehandlung mit Patientenurin größer als bei Vorbehandlung in Urin gesunder Probanden. Bei gleichzeitiger Vorbehandlung von Bakterien und Zellen waren die Attachment-Werte höher als bei der unvorbehandelten Reihe. Über die Vergleichbarkeit dieses Ergebnisses mit denen der anderen Reihen sind wir uns jedoch nicht sicher. Aber auch hier sind

die Attachment-Werte bei Vorbehandlung in Urin gesunder Probandinnen höher als bei Verwendung von Patientenurin. Während das Attachment generell in Urin höher war als in PBS, war die Desorption bereits haftender Keime durch PBS möglich, durch Urin nur wenig oder gar nicht. Das Bakterienwachstum in Urin ist langsamer als in PBS. Das Attachment dieser in Urin gezüchteter Keime entsprach aber dem der in BHI gezüchteten und unvorbehandelten Bakterien. Die Vorbehandlung der Bakterien vermindert also das Attachment, während die Züchtung der Keime in denselben Urinen das Attachment nicht beeinflusste.

Pat.	Att. in PBS	Att. in Urin	PBS/PBS	Urin/PBS	PBS/Urin	Urin/Urin
1	14,2	32,0	9,2	21,5	8,9	22,3
2	15,0	30,0	9,5	17,0	14,3	27,6
3	14,2	18,7	9,2	16,9	16,9	22,8
4	14,2	24,9	9,2	17,6	8,4	25,1
$\bar{m}$	14,4	26,4	9,3	18,3	12,1	24,5
5	14,2	55,0	9,2	37,1	16,9	51,4
6	14,2	35,1	9,2	14,8	9,5	32,8
7	14,2	34,9	9,2	17,5	14,9	8,6
8	30,6	56,9	10,3	33,8	19,9	41,1
$\bar{m}$	18,3	45,5	9,5	25,8	15,3	33,5

Tab. 13: Reihe 1; Unvorbehandelt.
(Bakterien/Zelle)

Pat.	Att. in PBS	Att. in Urin	PBS/PBS	Urin/PBS	PBS/Urin	Urin/Urin
1	4,8	19,6	1,9	9,8	2,5	18,6
2	5,4	12,9	4,8	8,9	5,6	23,6
3	5,5	11,1	3,3	9,3	5,6	28,4
4	6,4	22,8	2,0	9,4	3,3	13,8
$\bar{m}$	5,5	16,6	3,0	9,4	4,3	21,1
5	5,5	14,3	2,3	12,1	7,3	30,0
6	16,9	38,6	11,1	14,4	13,6	35,4
7	4,1	18,9	1,1	4,9	7,8	21,0
8	7,4	12,1	4,4	5,2	8,1	14,3
$\bar{m}$	8,5	21,0	4,7	9,2	9,2	25,2

Tab.14: Reihe 2; Vorbehandelte Bakterien
(Bakterien/Zelle)

Pat.	Att. in PBS	Att. in Urin	PBS/PBS	Urin/PBS	PBS/Urin	Urin/Urin
1	8,4	22,9	5,3	15,6	5,9	16,4
2	7,0	34,1	7,8	17,4	22,5	47,9
3	3,6	17,1	5,2	6,5	10,5	5,3
4	4,7	9,5	7,1	4,6	7,9	11,9
$\bar{m}$	5,9	20,9	6,4	11,0	11,7	20,4
5	5,6	29,4	4,0	11,8	5,8	25,8
6	13,0	30,9	8,9	15,9	19,1	39,8
7	8,9	19,4	6,3	13,5	6,8	24,6
8	3,9	11,4	3,1	10,7	12,3	15,0
$\bar{m}$	7,9	22,8	5,6	13,0	11,0	26,3

Tab.15: Reihe 3; Vorbehandelte Zellen
(Bakterien/Zelle)

Pat.	Att. in PBS	Att. in Urin
1	14,9	42,6
2	25,9	53,8
3	22,3	33,4
4	21,8	54,1
$\bar{m}$	21,2	46,0
5	27,4	55,3
6	39,5	67,3
7	23,5	47,1
8	20,3	46,1
$\bar{m}$	27,7	54,0

Tab.16: Reihe 4; Bak. & Zellen
vorbehandelt.
(Bakterien/Zelle)

D. STATISTIK

Auf Grund der strengen Kriterien bei der Patientenwahl und der technischen Schwierigkeiten bei der Urineinengung waren wir leider nicht in der Lage die Fallzahl in den Gruppen zu erhöhen; Wohlwissend, daß sich dies bei der statistischen Auswertung bemerkbar machen würde. In anbetracht des prospektiven Charakters dieser Studie sind die Tendenzen jedoch recht deutlich.

1. Wir bestimmten zunächst die Mittelwerte ($\bar{x}$) der haftenden Keime/40 Zellen, sowie die Mittelwerte innerhalb der Gruppen Krank - Gesund. In den Tabellen verwendeten wir nur die Mittelwerte.

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

2. Sodann errechneten wir die Standardabweichung (s) für die Gruppenwerte.

$$s = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

3. Die Standardabweichung des arithmetischen Mittels ($S\bar{x}$) - Standard error of mean SEM - errechneten wir lediglich für den Vergleich unserer Ergebnisse mit denen anderer Arbeiten, die diesen Wert verwendeten. Diese Werte sind hier nicht aufgeführt.

$$S\bar{x} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

4. Als statistisches Testverfahren für eine Aussage über die Signifikanz unserer Ergebnisse verwendeten wir eine Varianzanalyse (98). Bei diesem Test gehen wir bis zu einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,01$ von einer statistisch gesicherten Aussage aus; bis $p < 0,05$ von einer statistischen Auffälligkeit.

Schlüssel für die Varianzanalyse-Tabellen.

Status	=	S	Krank - Gesund.
Vorbehandlung	=	V	V ₁ - Unvorbehandelte Zellen und Bakterien. V ₂ - Vorbehandelte Bakterien. V ₃ - Vorbehandelte Zellen. V ₄ - Bakterien und Zellen vorbehandelt.
Messtyp	=	M	M ₁ - Attachment in PBS. M ₂ - Att. in Urin. M ₃ - Att. in PBS, Desorption in PBS. M ₄ - Att. in Urin, Des. in PBS. M ₅ - Att. in PBS, Des. in Urin. M ₆ - Att. in Urin, Des. in Urin.

Varianzanalyse-Tabellen.

Means				Standard Deviation	
Marginal					
Status	Krank	Gesund		Krank	Gesund
V1M1	14,4	18,3	16,3	0,4	8,2
V1M2	26,4	45,5	35,9	5,9	12,1
V2M1	5,5	8,5	7,0	0,7	5,8
V2M2	16,6	21,0	18,8	5,5	12,1
V3M1	5,9	7,9	6,9	2,2	4,0
V3M2	20,9	22,8	21,8	10,4	9,1
V4M1	21,2	27,7	24,5	4,6	8,4
V4M2	46,0	54,0	50,0	9,9	9,8
Marginal	19,6	25,7	22,7		
Count	4	4	8		

Mittelwerte und Standardabweichung mit 1 abhängigen Variablen für die Messtypen M₁ und M₂ bei allen Vorbehandlungen.

Status	Means			Standard Deviation	
	Krank	Gesund	Marginal		
			Krank	Gesund	
V1M1	14,4	18,3	16,3	0,4	8,2
V1M2	26,4	45,5	35,9	5,9	12,1
V1M3	9,3	9,5	9,4	0,2	0,6
V1M4	18,3	25,8	22,0	2,2	11,3
V1M5	12,1	15,3	13,7	4,2	4,4
V1M6	24,5	33,5	29,0	2,4	18,2
V2M1	5,5	8,5	7,0	0,7	5,8
V2M2	16,6	21,0	18,8	5,5	12,1
V2M3	3,0	4,7	3,9	1,4	4,5
V2M4	9,4	9,2	9,3	0,4	4,8
V2M5	4,3	9,2	6,7	1,6	3,0
V2M6	21,1	25,2	23,1	6,3	9,4
V3M1	5,9	7,9	6,9	2,2	4,0
V3M2	20,9	22,8	21,8	10,4	9,1
V3M3	6,4	5,6	6,0	1,3	2,6
V3M4	11,0	13,0	12,0	6,4	2,3
V3M5	11,7	11,0	11,4	7,4	6,1
V3M6	20,4	26,3	23,3	18,9	10,2

Mittelwerte und Standardabweichung mit 1 abhängigen Variablen für die Messtypen M_1 bis M_6 bei V_1 bis V_3 .

Source	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F	Tail probability
Mean	32837,88	1	32837,88	277,34	0,000
S	588,67	1	588,67	4,97	0,067
Error	710,41	6	118,40		
V	6207,31	3	2069,10	24,63	0,000
VS	215,36	3	71,79	0,85	0,482
Error	1512,04	18	84,00		
M	5160,61	1	5160,61	122,28	0,000
MS	81,68	1	81,68	1,94	0,214
Error	253,23	6	42,21		
VM	427,40	3	142,47	6,40	0,004
VMS	152,96	3	50,99	2,29	0,113
Error	400,43	18	22,25		

Varianzanalyse für die Messtypen $M_1 - M_6$ bei V_1 bis V_4 .
Tail probability = Irtumswahrscheinlichkeit p

Source	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F	Tail probability
Mean	33978,66	1	33978,66	208,73	0,000
S	560,11	1	560,11	3,44	0,113
Error	976,72	6	162,79		
V	2444,75	2	1222,38	6,82	0,011
VS	195,26	2	97,63	0,54	0,594
Error	2150,38	12	179,20		
M	7937,86	5	1587,57	40,67	0,000
MS	255,39	5	51,08	1,31	0,287
Error	1171,09	30	39,04		
VM	590,77	10	59,08	2,19	0,031
VMS	282,89	10	28,29	1,05	0,416
Error	1619,82	60	27,00		

Varianzanalyse für die Messtypen $M_1 - M_6$ bei V_1 bis V_3 .
Tail probability = Irtumswahrscheinlichkeit p

Trotz der relativ großen Unterschiede zwischen den Mittelwerten der verglichenen Daten Krank/Gesund, kann, auf Grund der geringen Fallzahlen in den Gruppen, eine statistisch gesicherte Differenz nicht bei allen Tests erbracht werden. Die Tendenz jedoch, ist erkennbar. Bei Verwendung der Mediane ($\tilde{x}$) an Stelle der Mittelwerte - ein eigentlich besserer Wert bei der Varianz der Zahl der haftenden Keime/40 Zellen - sind die statistischen Daten besser. Bei ausreichender Fallzahl, sowie bei Auswertung von mehr Zellen/Ansatz ist ein noch besseres Ergebnis zu erwarten.

E. DISKUSSION

Die Empfänglichkeit für das Attachment pathogener Keime, bzw. die fehlende Fähigkeit ein derartiges Attachment zu verhindern, scheint ein wesentlicher biologischer Defekt zu sein, oder zumindest die Folge eines solchen Defektes, der die HWI-prädisponierten Patientinnen von denen gegen rekurrierende Infektionen resistenten unterscheidet. Die vorliegende Arbeit sollte ein Beitrag dazu sein, diese lokale Abwehrschwäche näher zu umreißen.

In mehreren in Vitro Attachment- und Desorption-Tests verglichen wir den Einfluß von HWI-Patientenurin und dem gesunder Probanden auf das bakterielle Haftungsvermögen. Die Ergebnisse zeigten generell eine Tendenz zu höherem Attachment im Urinmilieu gesunder Kinder, also eine Attachment vermindernde Wirkung von Patientenurin. Dieses Resultat war zunächst für uns überraschend, erwarteten wir doch im Urin gesunder Probandinnen Attachment vermindernde Faktoren im Sinne der Gibbons'schen Speichelglykoproteine (117), bzw. Zellrezeptoren maskierende Faktoren zu finden. Es stellte sich uns somit die Frage, warum diese in Patientenurin anscheinend in höherem Maße vorhandenen Attachment vermindernde Faktoren, das Angehen von Infektionen nicht verhindern?

Zunächst glaubten wir, daß die Basalsekretion dieser Faktoren bei HWI-Patienten infolge der relativ häufigen Infektionen auch im schubfreiem Intervall erhöht ist, daß aber bei einer bakteriellen Invasion die adäquate Sekretionssteigerung, die bei Gesunden die Infektion verhindern, nicht erfolgt. In diesem Falle wäre die Interaktion der Keime mit den Mucosazellen der auslösende Reiz für eine Sekretionssteigerung. D. h. die Abwehrreaktion des Organismus würde erst nach dem bakteriellem Attachment erfolgen. Unsere Ergebnisse weisen jedoch keinen Einfluß von Urin auf bereits haftende Keime auf. Ein Abwehrmechanismus aber, der erst nach bakteriellem Attachment wirk-

sam wird, bereits haftende Keime jedoch nicht bekämpft, wäre insuffizient.

Wahrscheinlicher für unsere Ergebnisse ist eine andere Erklärung, die auch durch weitere Daten gefestigt wird. Die Übergangsepithelien des Harntrakts sind normalerweise von komplexen Carbohydraten bedeckt (40,67,83). Im Rahmen eines natürlichen Turnovers werden diese Glykokalix-Bestandteile der Mucosa abgeschilfert und im Urin ausgeschieden. Sie werden dann von neusezernierten Mucoproteinen und Mucopolysacchariden ersetzt. Es wäre nun denkbar, daß durch eine veränderte Zellphysiologie die Epithelien nicht in der Lage sind, diese regelrecht sezernierten Mucosa-Überzüge an ihrer Oberfläche zu halten bzw. zu binden. Die Folge wäre ein erhöhtes Turnover und damit eine gesteigerte Ausscheidung dieser Substanzen im Patientenurin. Wären diese Epithelzellsekrete nun für die Attachment-Inhibition verantwortlich, würde dies die dahingehende Wirkung von Patientenurin erklären. Der verbleibende dünnere oder gar fehlende Schleimüberzug der Epithelien würde auch die Beobachtung mehrerer Untersucher erklären, daß die Attachment-Werte an den Epithelien von HWI-Patientinnen höher waren als die an Zellen gesunder Probanden (20,49,100). Andere Arbeiten zeigen ein erhöhtes Attachment an Epithelien in Abwesenheit von Oberflächenbedeckenden Mucoproteinen (40, 83,96). Parsons et al. instillierten markierte Bakterien in Kaninchenblasen (83). 99,9 % der instillierten Aktivität wurde in kurzer Zeit eliminiert. Behandelte er jedoch die Blasenwand zuvor mit verdünnter HCL, so resultierte ein 20 - 100-facher Attachment Anstieg. 24 h nach der HCL-Behandlung hatte die Blase ihre vollständige Resistenz wiedererlangt. Wegen dieser kurzen Regenerationszeit vermuteten diese Autoren eine sekretorische Funktion der Schleimhaut. Sie versuchten auch die physiologischen Daten mit anatomischen Veränderungen der Blasenmucosa zu korrelieren. Blasenbiopsien von unbehandelten

Kaninchen zeigten in Färbungen mit kolloidalem Eisen und Hämatoxilin-Eosin einen dünnen Schleimbelag, der bei Biopsien nach HCL-Behandlung nicht mehr zu finden war. 24 h nach der Säure-Behandlung war in den Biopsien wieder ein Schleimbelag zu sehen. Ein derartiger Schleimbelag war auch bei menschlichen Blasenepithelien nachzuweisen. Kass und Norden inokulierten ihre radioaktiv markierten Bakterien in Meerschweinchen- und Ratten-Blasen (78). An den excidierten Blasen sank die Zahl der haftenden Keime erst schnell, später jedoch gar nicht. Sie postulierten für diese Beobachtung eine antibakterielle Substanz auf der Blasenmucosa, die in der intakten Blase ständig nachproduziert wird.

An den Epithelien der Mundschleimhaut wiesen Gibbons et al. ähnliche Ergebnisse nach (117). Trotz ständiger Exposition sind an den Wangenepithelien wenig Bakterien zu finden. Bei gewaschenen und in Vitro mit Streptokokken inkubierten Zellen, hafteten bereits nach 1 h 100-te von Keimen. Das schlüssige Ineinandergreifen all dieser Ergebnisse, läßt uns den Grund für die Disposition zu rekurrierenden HWI in einer labilen Epithelzellphysiologie suchen. Danach würde eine zumindest zeitweilige Veränderung der Zellphysiologie eine Ablösung der Mucoproteine und Polysaccharide der Glykokalix bewirken und dadurch den Bakterien ein erleichtertes Attachment ermöglichen. Wahrscheinlich sind in Abwesenheit der Sekrete mehrere oder entscheidendere Rezeptoren an den Zelloberflächen demaskiert und somit für die Bakterien erkennbar und zugänglich (Abb. 6).

Die labile Epithelzellphysiologie kann vermutlich durch viele Faktoren aus ihrem Gleichgewicht gebracht werden. So z.B. vielleicht auch durch Baden in kaltem Wasser über eine Art erweiterten Regelkreis - Baden in kaltem Wasser ist eine anamnestisch häufig erwähnte Coinzidenz bei HWI. Aller Wahrscheinlichkeit nach spielen auch hormonelle Faktoren eine

entscheidende Rolle für das Gleichgewicht der Zellphysiologie. So wurde nachgewiesen, daß die Attachmentwerte abhängig von der Zyklusphase sind, zu der die Zellen gesammelt wurden (7, 92). Auffällig ist auch, daß häufig die HWI junger Mädchen mit Beginn der Pubertät und mit Anstieg von Östrogene und Progesteron sistieren (75). Entsprechend kommt es in der Menopause zu einem Wiederanstieg der HWI (75). Interessant hierbei ist auch, daß Östrogene die Produktion von Mucoproteine und Mucopolysacchariden erhöhen, während Progesteron die Sekretion beeinflusst. Bei jungen Mädchen vor der Pubertät sind Östrogene mit den üblichen Standardmethoden nicht nachweisbar.

Ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit zeigt, daß in Urin gezüchtete Keime in ihrem Attachment-Verhalten sich kaum von den in BHI gezüchteten und unvorbehandelten Bakterien unterscheiden, während in Urin nur vorbehandelte Keime geringer adhärieren. Demnach passen sich die Bakterien während ihrer Vermehrung in Urin den veränderten Milieubedingungen an. Eine auch nur kurzzeitige erhöhte Möglichkeit für ein Attachment würde zum Anhaften einiger Keime genügen. Diese haftenden Bakterien können sich schneller vermehren als nicht adhärente Keime (105) und angepaßte Nachkommen bilden.

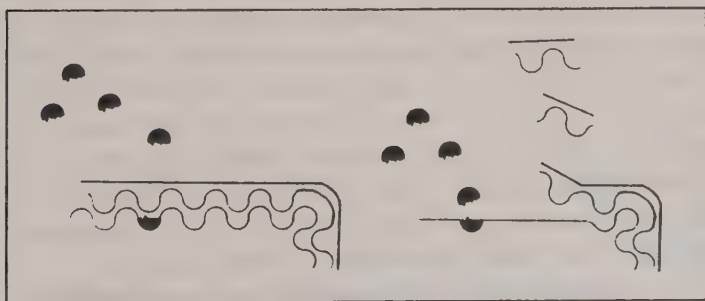


Abb.6: Model-Schema für die Ablösung des protektiven Schleimbelags von den Zelloberflächen und der Demaskierung der "Bakterien-Rezeptoren".

Wie auch wir, inkubierten die meisten in dieser Arbeit erwähnten Studien Bakterien und Epithelzellen, um dann die Anzahl der haftenden Keime pro Zelle mittels lichtmikroskopischer Auswertung zu bestimmen. Diese Technik ist einfach, billig und bietet ein visuelles Bild des zu beurteilenden Effekts. Ihr Nachteil liegt in der Notwendigkeit, eine große Anzahl Zellen zu untersuchen, sowie in der erforderlichen Sorgfältigkeit bei der Keimzählung - vorallem bei "Keimklumpung" - und der Differenzierung haftender Keime ähnlicher Morphologie. Alles Faktoren, die einen subjektiven Zählfehler vorschubleisten und die die Auswertung aller Ansätze durch den gleichen Untersucher erforderlich machen. Durch die Anwendung radioaktiv markierter Bakterien und ihrer quantitativen Bestimmung mit einer Zählkammer (82), könnten diese Nachteile umgangen werden. Diese zwar teurere Methode wäre einfacher, schneller und sensitiver bei der Auswertung. Die verfälschend hohe Background-Aktivität, Markierungsverlust und die Manipulation an den Keimen zur Aufnahme des Markers sind beherrschbare Probleme und die Ergebnisse correlieren gut mit denen bei lichtmikroskopischer Auswertung (103)

In der Regel verwenden in-Vitro-Studien frisch gesammelte Epithelien, während es sich bei den Keimen um häufig überimpfte Labor-Kulturen handelt. Häufige Passagen, verschiedene Wachstumsmedien und Wachstumsphasen jedoch (92,105), sowie verschiedene Inkubationsbedingungen, können das Attachmentverhalten signifikant beeinflussen. So z.B. werden Bakterien und ihre Attachment vermittelnden Fimbrien häufig von einer Glycocalix umhüllt. Dieser Belag fehlt bei manchen LaborKulturen (10). Auch ist bekannt, daß die biochemischen Bakterienmembranen sich mit der Wachstumsphase ändern (112). Diese Befunde könnten auch einen Einfluß auf das Agglutinationsverhalten der Labor-Bakterien in Urin ausüben.

In der vorliegenden Arbeit konnten wir ein unterschiedliches

Attachmentverhalten in Urinmilieu gegenüber dem in PBS nachweisen. Desgleichen auch bei der Desorption bereits haftender Keime. Wir halten daher PBS für ein insuffizientes Milieu bei Untersuchungen zur Pathogenese von HWI und geben dem Urinmilieu den Vorzug. Bei der Verwendung von Urinmilieu ist auf die schonende Aufarbeitung und Einengung der Urinproben zu achten, um eventuelle Enzymaktivitäten oder empfindliche Biochemische Strukturen zu erhalten.

Für spätere in-Vitro-Tests wäre eine standardisierung der Testbedingungen unter Berücksichtigung der erwähnten Faktoren wünschenswert.

Als weitere Untersuchung zur Erhärtung unserer Ergebnisse wären nun Attachment-Versuche im Urinmilieu von HWI-Patientinnen zu verschiedenen Krankheitsphasen sinnvoll. - Akuter Schub; schubfreies Interwall mit unterschiedlichen Abständen vor bzw. nach einer Infektion. Desweiteren wäre es interessant zu ermitteln, ob die Attachment-Anfälligkeit nur auf die Epithelien der ableitenden Harnwegen beschränkt ist, oder ob von einer generalisierten Wirtsempfänglichkeit für adhärende Bakterien ausgegangen werden kann. Ansonsten sehen wir sinnvolle Untersuchungen nur noch auf anderen Gebieten; In vergleichenden biochemischen Untersuchungen von Urin kranker und dem gesunder Probanden, sowie in der Untersuchung der anscheinend labilen Epithelzellphysiologie der HWI-Patienten.

F. LITERATURVERZEICHNIS

1. Anders, D.; J. Anders; F. C. Sitzmann: Fallstudie zur Epidemiologie inapparenter HWI bei Mädchen im Vorschulalter. Med. Klin. 69/45:1850-1859 (1974)
2. Bergström, T.; K. Lincoln; P. Ørskov; I. Ørskov; J. Winberg: Studies of urinary tract infections in infancy and childhood. VIII. Re-infection vs. relaps in recurrent urinary tract infections. Evaluation by means of identification of infecting organisms. J. Pediatr. 71,1:13-20 (1967)
3. Bergström, T.; K. Lincoln; B. Redin; J. Winberg: Studies of urinary tract infections in infancy and childhood. X. Short or long-term treatment in girls with first or second-time UTI uncomplicated by obstructive urological abnormalities. Acta Paediatr. Scand. 57:186-194 (1968)
4. Boen, T. R.; D. L. Sylvester: The mathematical relationship among urinary frequency, residual urine and bacterial growth in bladder infection. Invest. Urol. 2:468 (1965)
5. Bollgren, I.; J. Winberg: The periurethral aerobic bacterial flora in healthy boys and girls. Acta Paediatr. Scand. 65:74-80 (1976)
6. Bollgren, I.; J. Winberg: The periurethral aerobic flora in girls highly susceptible to urinary infections. Acta. Paediatr. Scand. 65:81-87 (1976)
7. Botta, G. A.: Hormonal and Type-dependent adhesion of group B Streptococci to human vaginal cells. Infect. Immun. 25: 1084-1086 (1979)
8. Burke, J. B.: Pyelonephritis in infancy and childhood. Lancet, II:1318 (1961)
9. Cooke, E. M.: Escherichia coli and man. Churchill Livingstone, Edinburgh: 31-46 (1974)
10. Costerton, J. W.; G. G. Geesey; K. V. Cheng: How bacteria stick. Scientific American 238:86-95 (1978)
11. Cotran, R. S.; E. Vivaldi; D. P. Sangwill; E. H. Kass: Retrograde Proteus Pyelonephritis in rats. Am. J. Pathol. 43:1 (1963)
12. Cox, C. E.; P. Hinman: Experiments with induced bacteriuria, vesical emptying and bacterial growth on the mechanism of bladder defense to infection. J. Urol. 86:739-748 (1961)
13. Cox, C. E.; P. Hinman: Factors in resistance to infection in the bladder. I. The eradication of bacteria by vesical emptying and intrinsic defence mechanisms. In E. H. Kass (ed.): Progress in pyelonephritis. F. A. Davies Co; Philadelphia :563 (1965)
14. Davies, J. N.; G. L. Gibson; U. N. Littlewood; S. R. Meadow: Prevalence of bacteriuria in infants and preschool children. Lancet, II:7-10 (1974)
15. De Luca, F. G.; J. H. Fisher; O. Swenson: Review of recurrent urinary tract infections in infancy and childhood. New Eng. J. Med. 268:75 (1963)
16. Domingue, G. A.; Salhi; C. Rountree; W. Little: Prevention of experimental hematogenous and retrograde pyelonephritis by antibodies against enterobacterial common antigen. Infect. Immun. 2:175-182 (1970)
17. Elkins, I. B.; C. E. Cox: Perineal vaginal and urethral bacteriology of young women. I. Incidence of gram-negative colonization. J. Urol. 111:88-92 (1974)
18. Ellen, R. P.; R. J. Gibbons: Parameters affecting the adherence and tissue-tropisms of Streptococcus pyogenes. Infect. Immun. 9:85-91 (1974)
19. Fair, W. R.; J. Couch; N. Mehner: Prostatic antibacterial factor. Urology, 7:169 (1976)
20. Fowler, J. E.; T. E. Stamey: Studies of introital colonization in women with recurrent urinary infections. VII. The role of bacterial adherence. J. Urol. 117:472-476 (1977)
21. Freeman, L. R.: Natural history of urinary infection in adults. Kidney Intern. 8/4:96-100 (1975)
22. Freeman, R. B.: Does bacteriuria lead to renal failure? Clin. Nephrol. 1/2:61-62 (1973)

23. Fubara, E.S.; R. Freter:
Availability of locally synthesized and systemic antibodies in the intestine.
Infect. Immun. 6:965-981 (1972)
24. Fubara, E.S.; R. Freter:
Protection against enteric bacterial infection by secretory IgA antibodies.
J. Immunol. III:395 (1973)
25. Gibbons, R.J.:
Bacterial adherence to mucosal surface and its inhibition by secretory antibodies.
Adv. Exp. Med. Biol. 45:315 (1974)
26. Gibbons, R.J.:
Adherence of bacteria to host tissue.
In Microbiology, D. Schlessinger (ed.)
Am. Soc. For Microbiol.; Washington D.C.: 395-406 (1977)
27. Gibbons, R.J.; J. van Houte:
Selective bacterial adherence to oral epithelial surface and its role as an ecological determinant.
Infect. Immun. 3:567-573 (1971)
28. Gibbons, R.J.; J. van Houte:
Bacterial adherence in oral microbial ecology.
Ann. Rev. Microbiol. 29:19-44 (1975)
29. Gould, K.; C.H. Ramirez-Ronda; R.K. Holmes; J.P. Sanford:
Adherence of bacteria to heart valves in vitro.
J. Clin. Invest. 56:1364-1370 (1975)
30. Griffin, P.J.A.; J.R. Salaman:
Urinary tract infections after renal transplantation: Do they matter?
Brit. Med. J. 1:710-711 (1979)
31. Grüneberg, R.N.; D.A. Leigh; W. Brumfitt:
E. coli serotypes in UTI. Studies in domiciliary, antenatal and hospital practice.
In F. O'Grady and W. Brumfitt (ed.) Urinary tract infection; Oxford Univ. Press, London :68-79 (1968)
32. Hallmann, L.; F. Burkhardt:
Klinische Mikrobiologie
Thieme Verlag (1974)
33. Hanson, L.A.; J. Holmgren; U. Jodal; B. Kaijser; I. Lönnroth; C. Madsworth:
Immunoglobulines in urines of children with urinary tract infections.
In D.H. Dayton, P.A. Small, R.M. Chanock, H.E. Kaufman, T.B. Tomasi (ed.) The secretory immunologic system; Government printing office, Washington D.C.:367-383 (1971)
34. Hanson, L.A.; J. Winberg; H.J. Andersen; J. Holmgren; U. Jodal; B. Kaijser:
Significance of serum and urine antibodies in UTI in childhood.
In P. Kincaid-Smith and K.F. Fairley (ed.) Renal infection and renal scarring; Mercedes, Melbourne:117-132 (1971)
35. Hanson, L.A.; S. Ahlstedt; B. Carlsson; U. Jodal; U. Lindberg; A. Sohl:
Studies of secretory antibodies to E. coli in human urine compared to the serum antibody content.
In J. Mestecky and A.R. Lavton (ed.) The immunoglobulin A system; *Adv. Exp. Med. Biol.* 45:399 (1974)
36. Hanson, L.A.; S. Ahlstedt; A. Fasth; U. Jodal; B. Kaijser; P. Larsson; U. Lindberg; S. Ölling; A. Sohl-Akerlund; C. Svanborg-Edén:
Antigens of E. coli, human immune response and the pathogenesis of UTI.
J. Infect. Dis. 136:144 (1977)
37. Helmholtz, H.F.Jr.:
Determination of the bacterial content of the urethra: A new method, with results of a study of 82 men.
J. Urol. 64:158 (1950)
38. Heptinstall, R.H.:
Experimental pyelonephritis; Ascending infection of the rats kidney by organisms residing in the urethra.
Brit. J. Exp. Pathol. 45:436 (1964)
39. Hodson, L.J.; S. Wilson:
Natural history of chronic pyelonephritic scarring.
Brit. Med. J. 191 (1965)
40. Järvinen, A.K.; M. Sandholm:
Urinary Oligosaccharides inhibit adhesion of E. coli onto canine urinary tract epithelium.
Invest. Urol. 17/6:443-445 (1980)
41. Janas, M.; T. Vesikari; O. Hällström; R. Anttila:
Suppressed lymphocyte mitogen-responsiveness in UTI of children and its correlation to pyelonephritis.
Acta Paediatr. Scand. 68:501-506 (1979)
42. Jodal, U.:
The immune response to UTI in childhood. I. Serological diagnosis of primary symptomatic infection in girls by indirect hemagglutination.
Acta Paediatr. Scand. (1974)
43. Jodal, U.; S. Ahlstedt; B. Carlsson; L.A. Hanson; U. Lindberg; A. Sohl:
Local antibodies in childhood UTI. A preliminary study.
Int. Arch. Allergy (1974)

44. Jones, G.W.:
The attachment of bacteria to the surfaces of animal cells.
In J.L. Reissing (ed.) Microbiol. interactions: Receptor and recognition; Chapman and Hall, London 3/B:139-176 (1977)
45. Joppich, G.; M. Kienitz; W. Margot; H. Schönfeld:
Bakterielle Infektionen im Kindesalter.
Hahnenklee Symposium (1975)
46. Kaijser, B.:
Immunological studies on some *E. coli* strains with special reference to K antigen and its relation to UTI.
J. Infect. Dis. 127:670-677 (1973)
47. Kaijser, B.; J. Holmgren; L.A. Hanson:
The protective effect against *E. coli* O and K antibodies of different immunoglobulin classes.
Scand. J. Immun. 1:27-32 (1972)
48. Kaijser, B.; S. Ahlstedt:
Protective capacity of antibodies against *E. coli* O and K antigens.
Infect. Immun. 17/2:286-289 (1977)
49. Källonius, G.; J. Winberg:
Bacterial adherence to piriurethral epithelial cells in girls prone to UTI.
Lancet, I:540-543 (1978)
50. Kass, E.H.:
Bacteriuria and the pathogenesis of pyelonephritis.
Lab. Invest. 9:110-116 (1960)
51. Kass, E.H.; S.H. Zinner:
Bacteriuria and renal disease.
J. Infect. Dis. 120:27-46 (1969)
52. Kass, E.H.; M.E. Miall; K.L. Stuart; B. Rosner:
Epidemiologic aspects of infection of the urinary tract.
In E.H. Kass, W. Brumfitt (ed.) *Infections of the urinary tract*; Univ. of Chicago Press, Chicago/London:1 (1975)
53. Kern, W.H.:
Epithelial cells in urine sediments.
Am. J. Clin. Pathol. 56:67-72 (1970)
54. King, D.W.; S.R. Paulson; N.L. Puckett; A.T. Krebs:
Cell death. IV. The effect of injury on the entrance of vital dye in Ehrlich tumour cells.
Am. J. Pathol. 35:1067-1079 (1959)
55. Kivistö, A.; K. Vasenius; L.A. Lindberg; M. Sandholm:
Desorption assay. A functional in vitro test for measuring the adhesion of *E. coli* on the urinary tract epithelium.
Invest. Urol. 15:412 (1978)
56. Köhler, L.; H. Fritz; B. Schersten:
Health control of four-year-old children. A study of bacteriuria.
Acta Paediatr. Scand. 61:289 (1972)
57. Korhonen, T.; K. S. Edén; C. Svanborg-Edén:
Binding of purified *E. coli* pili to human urinary tract epithelial cells.
FEMS Microbiol. Letters 7:237-240 (1980)
58. Kouvalainen, K.; P. Pelkonen; K. Viikari-Juntura:
Immunoglobulins in chronic UTI in children.
Ann. Clin. Res. 1:182 (1969)
59. Kunin, C.M.:
Emergence of bacteriuria, proteinuria and symptomatic UTI among a population of schoolgirls follows for 7 years.
Pediatr. 41:968-976 (1968)
60. Kunin, C.M.; R. Deutscher; A. Paquin Jr.:
UTI in school children: An epidemiologic, clinical and laboratory study.
Medicine 43:91 (1964)
61. Kunin, C.M.; R. Southall; A. Paquin Jr.:
Epidemiology of UTI: A pilot study of 3057 school children.
New Eng. J. Med. 263:817 (1960)
62. Kunin, C.M.; E. Zache; A. Paquin Jr.:
UTI in schoolchildren: I. Prevalence of bacteriuria and associated urologic findings.
New Eng. J. Med. 266:1287-1296 (1962)
63. Lindberg, U.; S. Ahlstedt; L.A. Hanson; A. Sohl:
Determination of *E. coli* antibodies in unconcentrated urine from patients with ABU with enzyme-linked immunosorbent assay.
Scand. J. Immun. 2:321 (1973)
64. Lindberg, U.; I. Claesson; L.A. Hanson; U. Jodal:
ABU in schoolgirls. I. Clinical and laboratory findings.
Acta Paediatr. Scand. 64:425-431 (1975)
65. Lindberg, U.; L.A. Hanson; U. Jodal; G. Lidin-Jansson; K. Lincoln; S. Ölling:
ABU in schoolgirls. II. Differences in *E. coli* causing asymptomatic and symptomatic bacteriuria.
Acta Paediatr. Scand. 64:432-436 (1975)
66. Lindblad, B.S.; K. Ekengren:
The long-term prognosis of nonobstructive UTI in infancy and childhood after the advent of sulphonamide.
Acta Paediatr. Scand. 58:25-32 (1969)
67. Lundblad, A.:
Oligosaccharides from human urine.
In V. Ginsburg (ed.) *Methods in enzymology*; Academic Press, New York/LC:226 (1978)

68. Mabeck, C.E.; F. Ørskov; I. Ørskov:
E. coli serotypes and renal involvement in UTI.
Lancet, I:1312-1314 (1971)
69. Macaulay, D.; R.N.P. Sutton:
The prognosis of UTI in childhood.
Lancet, II:1318 (1957)
70. Marget, W.; B. Reindke:
Neuere Beobachtungen zur Frage der Pathogenese der nichtobstruktiven chronischen HWI.
Med. Klin. 69:1767-1773 (1974)
71. Mc Neish, A.S.; J. Fleming; P. Turner; N. Evans:
Mucosal adherence of human enteropathogenic E. coli.
Lancet, :946-948 (Nov. 1975)
72. Metzger:
Bakteriologische Fragen bei der Blasenmanometrie.
Diss. München (1979)
73. Mildnerberger, H.; H. Fendel; W. Marget:
Langzeitkulturen nach Harnwegsinfektion im Säuglings- und Kindesalter.
In H. Losse und M. Kienitz (ed.) Die Pyelonephritis; Thieme Verlag, Stuttgart (1966)
74. Monson, O.T.; E.M. Ory; H.L. Dobson; E. Carter; E.M. Fox:
A comparison of bacterial counts of the urine obtained by needle aspiration of the bladder, catheterization and midstream voided methods.
New Eng. J. Med. 259:764 (1958)
75. Mulholland, S.G.:
Lower urinary tract antibacterial defence mechanisms.
Invest. Urol. 17/2:593-597 (1979)
76. Murray, T.; M.D. Goldberg:
Etiologies of chronic interstitial nephritis
Ann. Intern. Med. 82:455-459 (1975)
77. Neter, E.:
Antibody response of patients with infection of the urinary tract; Aid to understanding of pathogenesis and to diagnosis and prognosis.
In H. Losse und M. Kienitz (ed.) Pyelonephritis; Thieme Verlag Stuttgart III:101-108 (1972)
78. Norden, C.W.; G.M. Green; E.H. Kass:
Antibacterial mechanisms of the urinary bladder.
J. Clin. Invest. 47:2689-2700, 2869 (1968)
79. Øftek, I.; E.H. Beachey; N. Sharon:
Surface sugars of animals cells as determinants of recognition in bacterial adherence
Trends Biochem. Sci. 3:159-160 (1978)
80. Øftek, I.; D. Mirelman; N. Sharon:
Adherence of E. coli to human mucosal cells mediated by mannose receptors.
Nature (Lond.) 265:623-625 (1977)
81. O'Grady, F.; W.R. Cattell:
Kinetics of UTI. II. The bladder.
Brit. J. Urol. 38:156 (1966)
82. Parsons, C.L.; H. Anwar; C. Stauffer; I.D. Schmidt:
In vitro adherence of radioactively labeled E. coli in normal and cystitis-prone females.
Infect. Immun. 26/2:453-457 (1979)
83. Parsons, C.L.; C. Greenspan; S.W. Moore; S.G. Mulholland:
Role of surface mucin in primary antibacterial defense of bladder.
Urology 9/1:48 (1977)
84. Pearce, W.A.; T.M. Buchanan:
Attachment role of gonococcal pili.
J. Clin. Invest. 61:931-943 (1978)
85. Percival, A.; W. Brumfitt; J. de Louvois:
Serum-antibody levels as an indication of clinically inapparent pyelonephritis.
Lancet II:1027-1033 (1964)
86. Pyles, C.V.; B.A. Wherrett; J.M. McCarthy:
Urinary tract infections in infants and children.
Am. J. Dis. Child. 108:1 (1964)
87. Raaschou:
Studies of chronic pyelonephritis with special reference to the kidney function.
Ejnar Munksgaard Copenhagen :260 (1948)
88. Riedasch, G.E.; E. Ritz; K. Möhring; J. Banmer:
Antibody coating of urinary bacteria; Relation to site of infection and invasion of uroepithelium
Clin. Nephrol. 10/6:239-244 (1978)
89. Rostgaard-Christensen, E.:
Urinvejsinfektion hos børn, specielt med henblik på den sene prognose.
Akademisk afhandling; Munksgaard, Copenhagen (1964)
90. Savage, D.C.:
Survival on mucosal epithelia, epithelial penetration and growth in tissue of pathogenic bacteria.
In H. Smith and J.H. Pearce (ed.) Microbial Pathogenicity in Man and Animals; Cambridge Univ. Press, New York :25-51 (1972)
91. Savage, D.C.; H. I. Wilson; M. McHardy; D.A.E. Dewar
W.M. Fee: Covert bacteriuria of childhood. A clinical and epidemiological study.
Arch. Dis Child 48:8 (1973)
92. Schaeffer, A.J.; S.K. Amundsen; L.N. Schmidt:
Adherence of E. coli to human urinary tract epithelial cells.
Infect. Immun. 24/3:753-759 (1979)

93. Schärer, K.:
Epidemiologie der Pyelonephritis im Kindesalter.
Hahnenklee Symposium Pyelonephritis
ed. Roche :1 (1976)
94. Schlechter, M.; C. D. Leonhard; B. H. Scribner:
Chronic pyelonephritis as a cause of renal failure in dialysis candidates.
JAMA 216:514-517 (1971)
95. Sharon, R.; M. D. Siegel et al.:
Urinary infection in infants and preschool children.
Am. J. Dis. Child. 134:369-372 (1980)
96. Shrom, S. H.; C. L. Parson; S. G. Mulholland:
Role of urothelial surface mucoprotein in intrinsic bladder defense.
Urology 9:526 (1977)
97. Smellie, J. M.; J. C. S. Normand:
Experience of follow up of children with UTI.
In F. O'Grad and W. Brumfitt (ed.) Urinary Tract Infection; Oxford Univ. Press :123 (1968)
98. Snedecor, G. W.; W. G. Cochran:
Statistical Methods 6th. ed.
Iowa State Univ. Press, Ames/Iowa :59 (1967)
99. Stamey, T. A.; W. R. Fair; M. M. Timothy; H. K. Chung:
Antibacterial nature of prostatic fluid.
Nature 218:444-447 (1968)
100. Stamey, T. A.; C. C. Sexton:
The role of vaginal colonization with enterobacteriaceae in recurrent urinary infections.
J. Urol. 113:214-217 (1975)
101. Steele, R. E. Jr.; G. W. Leadbetter; J. D. Crawford:
Prognosis of childhood urinary tract infection.
New Eng. J. Med. 269:883 (1963)
102. Ström, J.:
Cytology of the urine in healthy persons and cytological reactions in acute infection
Scand. J. Infect. Dis. 5:209-228 (1973)
103. Sugarman, B.; S. T. Donta:
Adherence of enterobacteriaceae to human buccal cells.
J. Med. Microbiol. 12:373-378 (1979)
104. Svanborg-Edén, C.:
Attachment of *E. coli* to human urinary tract epithelial cells. An *in vitro* test system applied in the study of UTI.
Scand. J. Infect. Dis. Suppl. 15:1-69 (1978)
105. Svanborg-Edén, C.; B. Eriksson; L. A. Hanson:
Adhesion of *E. coli* to human uroepithelial cells *in vitro*.
Infect. Immun. 18:767-774 (1977)
106. Svanborg-Edén, C.; B. Eriksson; L. A. Hanson; U. Jodal; B. Kaijser; L. Janson; U. Lindberg; S. Ölling:
Adhesion to normal human uroepithelial cells of *E. coli* from children with various forms of UTI.
J. Pediatr. 93/3:398-403 (1978)
107. Svanborg-Edén, C.; L. A. Hanson; U. Jodal; U. Lindberg et al.:
Variable adherence to normal human urinary tract epithelial cells of *E. coli* strains associated with various forms of UTI.
Lancet II:490-492 (1976)
108. Svanborg-Edén, C.; H. A. Hansson:
E. coli pili as possible mediators of attachment to human urinary tract epithelial cells.
Infect. Immun. 21/1:229-237 (1978)
109. Svanborg-Edén, C.; A. M. Svennerholm:
Secretory IgA and IgG antibodies prevent adhesion of *E. coli* to human urinary tract epithelial cells.
Infect. Immun. 22:790-797 (1978)
110. Turck, M.; R. G. Petersdorf; M. R. Fournier:
The epidemiology of non enteric *E. coli* infections; Prevalence of serological groups
J. Clin. Invest. 41:1760-1765 (1962)
111. Turck, M.; A. R. Ronald; H. Clark et al.:
Studies on the epidemiology of *E. coli*, 1960-1968.
J. Infect. Dis. 120:13-16 (1969)
112. van de Rijn, I.; R. E. Kessler:
Chemical analysis of changes in membrane composition during growth of *Streptococcus pyogenes*.
Infect. Immun. 26:883-891 (1979)
113. Vivaldi, E.; R. Cotran; D. P. Zangwill; E. H. Kass:
Ascending infection as a mechanism in the pathogenesis of experimental non-obstructive pyelonephritis.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 102:242 (1959)
114. Vosti, K. L.; L. M. Goldberg; A. S. Monto; L. A. Rantz:
Host-parasite interaction in patient with infections due to *E. coli*. I. The serogrouping of *E. coli* from intestinal and extraintestinal sources.
J. Clin. Invest. 43:2377 (1964)
115. Wharton, L. R.; L. A. Gray; H. G. Guild:
The late effects of acute pyelitis in girls
JAMA, 109:1597 (1937)
116. Williams, R. C.; R. J. Gibbons:
Inhibition of bacterial adherence by secretory immunoglobulin A; A mechanism of antigen disposal.
Science, 177:697 (1972)

117. Williams, R.C./R.J. Gibbons:
Inhibition of streptococcal attachment to
receptors on human buccal epithelial cells
by antigenically similar salivary glyco-
proteins.
Infect. Immun. 11:711-718 (1975)
118. Winberg, J.; H.J. Andersen; T. Bergström et al.:
Epidemiology of symptomatic UTI in child-
hood.
Acta Paediat. Scand. Suppl. 252:1-20 (1974)
119. Winberg, J.; H.J. Andersen; L.A. Hanson; K.
Lincoln: Studies on UTI in infancy and
childhood. I. Antibody response in differ-
ent types of UTI caused by coliform
bacteria.
Brit. Med. J. 2:524-527 (1963)
120. Winberg, J.; T. Bergström; L.A. Hanson:
Neue Gesichtspunkte zur HWI mit E. coli.
Msch. Kinderheilk. 119:506-514 (1971)
121. Winberg, J.; H. Larson; T. Bergström:
Comparison of the natural history of
urinary infection in children with and
without vesicoureteric reflux.
In P. Kincaid-Smith and K.F. Fairley (ed.)
Renal infection and renal scarring;
Mercedes, Melbourne :293 (1971)
122. Woodruff, J.D.; H.S. Everett:
Prognosis in childhood urinary tract infec-
tions in girls.
Am. J. Obstet. Gyn. 68:798 (1954)

Lebenslauf

Ich wurde am 19.04.56 als zweiter Sohn von Ibrahim und Cornelia Seif El Nasr in Alexandria/Ägypten geboren.

1960, mit 4 Jahren, besuchte ich das französische Pensionat Notre Dame de Sion in Alexandria (Vorschule), von dem ich, 1961 - 1965, auf das ebenfalls französische College St. Marc wechselte (Volksschule).

1965, mit 9 Jahren, kam ich nach Deutschland.

Hier besuchte ich von 1966 - 1976 das Gymnasium. Mein Abitur legte ich 1976 am Nymphenburger Gymnasium in München ab.

Seit dem WS 76/77 bin ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München für das Fach Humanmedizin immatrikuliert.

Zur Zeit absolviere ich das Praktische-Jahr am Klinikum Großhadern.

